(18)日本田代町(1 5)

(12) 公開特許公報(4)

特開2001-352986 (11)特許出版公园番号

(P2001-352986A)

平成13年12月25日(2001, 12, 25) (474). j-c2-6 2B030 2G045 4 (43)公開日 A 0 1 K 67/027 A01H 5/00

> **M**SIESH ZNA

(21)出版集号	♦ #12000 - 175475(P2000 - 175475)	(71) 出版人	(71) 出国人 000001029
			協和觀聽工業株式会社
(22) // (EE)	平成12年6月12日(2000.6.12)		東京都千代田区大平町1丁月6番1号
		(72) 発明者	<b>小笛 垃圾</b>
			東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和閩
			即工業株式会社東京研究所内
		(72) 発明者	<b>国 湖</b>
			東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協
			和原群工具体式会社本社内
		(72) 発明者	太田 紀夫
			東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和職
			野工業株式会社東京研究所內
			1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
			MARININA

(54) [発列の名称] 新規ポリスプチド

ンチセンスDNA/RNA、酸DNAを用いた遺伝子治 後、数ポリペンチドを記載する抗体、数ポリペプチドの ド、 駄ボリペプチドをコードするDNA、 敷DNAのア **活性上昇改変体、 数ポリペプチドのドミナントネガティ** 【駅間】NFー×Bの活性化が関与する疾患の治療薬、 予防薬 および砂炉素の袋袋、開発に女用なポリペプチ ブ度質は、およびこれらの利用法を提供する。

【解決手段】NFーxBを活性化するポリペプチドを同 危し、数ポリペプチドをコードするDNA、および数ポ リペプチドを記載する抗体を製造する。これらはNFー \* Bの活性化が関与する疣虫の治療薬の探察ならびに診 断に利用することができる。

【柳次項1】 配列番号1~5のいずれかで喪されるア ミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有す るボリペプチド

ミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列におい て1以上のアミノ睦が欠失、団換および/または付加さ れたアミノ酸配列からなり、かつNFー×Bの活性を上 【簡求項2】 配列番号1~5のいずれかで扱されるア 昇させる活性を有するポリペプチド。

アミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列と6 0%以上の相同性を有するアミノ酸配列を合み、かつN 【糖求項3】 配列番号1~5のいずれかで扱される FIx Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチ

最低点に扱く

(全 52 页) Ω 501

70

未創収 開収項の数56

长期技能

501

67/033 A01K 67/02/ C12N 15/09 9/00

A01H (51) Int.Cl.

A 6 1 K 38/00

4B024 4B063 4B064

67/033 A 6 1 K 39/395 【前求項4】 請求項1~3のいずれか1項に配配のボ

【精求項5】 配列番号6~10のいずれかで喪される リペプチドをコードするDNA。 協島配列を有するDNA。

リンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであ 【創求項6】 創求項4または5に配載のDNAとスト り、かつ転写因子NF~×Bの活性を上昇させる活性を なかるポンペプチドやコードするDNA。

【解求項7】 類求項4~6のいずれか1項に配載のD NAをベクターに組み込んで得られる組換え体ベクタ 【情状項8】 開状項4~6のいずれか1項に記載のD N A と相同な配列からなる R N A をベクターに組み込ん で得られる組換え体ベクター。

【樹次項9】 RNAが1本鎖である間次項8配配の組 換え体ベクター。

【精求項10】 請求項7記載の組換え体ベクターを保 【格女母11】 形質院校体が、領生物、影物細胞、結 有する形質転換体。

物細胞、および昆虫細胞からなる群より選ばれる形質転 【樹坎県12】 微生物が、Escherichia属に属する微 【柳水項13】 動物細胞が、マウス・ミエローマ細 生物である、間求項11配戴の形質転換体。 校体である、請求項10配載の形質転換体。

細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル製 一・・・ 語句、カト昭の財政価値およびカトロ自体値間から 間、サット・ミエローマ笛間、マウス・ハイブリドーマ 随相間、Namaiwa相間、Namaiwa KJM 遺ばれる動物細胞である、顔求項11配載の形質転換 【都次項:4】 昆虫细胞が、<u>Spodotera frugiperda</u> の卵巣細胞、<u>Trichoplusia ni</u>の卵巣細胞およびカイコ の卵巣細胞から遺ばれる昆虫細胞である、開水項:1 配

ック動物またはトランスジェニック植物である、精状項 【間状図15】 形質危数体が、非ヒトトランスジュニ

8

特開2001-352986

3

- 0 記載の形質散数符。

【鶴水及16】 鶴水頂10~14のいずれか1度に記 数の形質転換体を始地に培養し、培養物中に創収項1~ せ、 数倍量物から数ポリペプチドを採取することを特徴 3のいずれか!項に配載のポリペプチドを生成、蓄積さ とする、数ポリペプチドの製造方法。 [請求項17] 請求項7配載の組換え体DNAを保存 する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、翻状項し ~3 のいずれか」項に配載のポリペプチドを鼓動物中に 生成、蓄積させ、眩動物中より眩ボリペプチドを採取す ることを特徴とする、数ポリペプチドの製造方法。

【ிの表現18】 智信が動物のミルク中であることを特 做とする、顔水項 1.7 配載の製造法。

するトランスジェニック植物を栽培し、顔水切1~3の 替債させ、敵植物中より骸ポリペプチドを採取すること いずれか!扱い記載のポリペプチドを取益物中に生成、 を特徴とする、数ポリペプチドの製造法。

【創水項20】 創水項4~6のいずれか1項に配め DNAを用い、in vitroでの転写・開収系により、核D NAのコードするポリペプチドを合成することを特徴と する、数ポンペプチドの製造符。

8

【酢求項21】 酢水項1~3のいずれか1項に配敷の ポリペプチドを記載するだは。 【格文項22】 請求項4~6のいずれか1項に記載の DNAの塩基配列中の連続した5~60塩基からなる配 列を有するオリゴヌクレオチドまたは眩ヌクレオチドと 相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド。

【楠求項23】 間求項4~6のいずれか1項に配載の ローブとして用いてハイブリダイゼーションを行うこと を含む、甜求項1~3のいずれか!項に配戴のポリペプ DNAまたは翻求項22配載のオリゴヌクレオチドをブ

【的坎坷24】 (創水項22配配のオリゴヌクレオチド をプライマーとして用いたポリメラーゼ・チュイン・リ アクションを行うことを含む、糖求項1~3のいずれか 1項に配戴のポリペプチドをコードするDNAの発現を チドをコードするDNAの発現を検出する方法。

【創水項25】 創水項4~6のいずれか1項に記載の DNAまたは指求項22記載のオリゴヌクレオチドを用 い、ハイブリダイゼーション法により、創状項1~3の いずれか!項に記載のポリペプチドをコードするDNA 検出する方法。

【梢火斑26】 駒状斑22配戦のオリゴヌクレオチド ことを含む、請求項1~3のいずれか1項に配数のポリ を用いたポリメラーボ・チェイン・リアクションを行う ペプチドをコードするDNAの登<mark></mark>界を検出する方法。 の変異を検出する方法。

【精求項27】 感染や炎症を伴う疾患、異常な平消筋 細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な嫌疑が細胞の活性化 を伴う疾患、異常な清觀組織の活性化を伴う疾患、膵臓

BEST AVAILABLE COPY

8 細胞の障害を伴う疾患、異常な験者細胞の活性化を伴 5 成団、異常な免疫価値の活性化を伴う疾患、または異 常な価値情報を伴う疾患を検出するために用いる、請求 項23~26のいずれか1項に配載の方法。

19、HIV成兒、便性B型肝炎に代表される语動住後性 肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各 【創収項28】 感染や炎症を伴う疾用が、微生物感 傷脳脊髄炎、もし自性心不全、エンドトキシンショッ

**内、外傷性脳損傷または炎症性関疾用であり、異常な平** ク、欧血虚、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿 荷筋細胞の分化増強を伴う皮根が動脈硬化または再狭物 であり、賢常な棣雄芸細胞の活性化を伴う疾患が肺線維 位であり、腎常な液臓組織の活性化を伴う疾患がリウマ **子住間即攻または仮形性関節攻であり、膵臓が細胞の**種 哲を伴う英语が健尿病であり、異常な破骨細胞の活性化 を伴う疾患が骨粗粘値であり、異常な免疫細胞の活性化 を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、 在粉症、 気 道過戦または自己免疫疾患であり、異常な細胞増強を伴 う疾患が急性骨軽性白血角または限性腫瘍である、糖浆

【胡沢頃29】 類坎珥4~6のいずれか1項に配戴の DNA または 糖水項 2 2 配載のオリゴヌクレオチドを用 いることを特徴とする、鶴坎頂1~3のいずれか1項に 配戴のポリペプチドをコードするDNAの転写またはm RNAの翻訳を哲制する方法。

項27記載の方法。

【樹氷項30】 間氷項4~6のいずれか1項に配截の いることを特徴とする、請求項1~3のいずれか1項に DNAまたは枯火頃22配殻のオリゴヌクレオチドを用 記載のポリペプチドをコード する DNA のプロセーター 領域および転写制御領域を取得する方法。 【**削水項32】 開水頃4~6のいずれか!現に配拠の** DNA、または請求項8若しくは9のいずれか!項に配

【請求項31】 請求項1~3のいずわか1項に配成の

ポリペプチドか四も困難。

【精水項33】 制氷項21配配の抗体を含む医薬。 気の指数大体人ケケーからな思慮。 (別決項34)

額収項22記載のオリゴヌクレオチド

ポリペプチドが免疫既活作用を在する [胡米和35] を合む医説

【粉次項36】 免疫既活作用を介して抗腫瘍活性およ び抗ウイルス活性を誘導することを特徴とする間収収3 ことを特徴とする情状項31配数の四素。 5配数の限数。

の活性化を伴う疾患、異常な清腫組織の活性化を伴う疾 四瀬が、原原や炎症を伴う疾患、異常 な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な酸粧芽細胞 **町、野間の抽物の物を作う疾患、異常な戦争阻抗の治** 異常な細胞性強を伴う疾患または神経細胞の障害に誘う く的色の治療はよび/または予防のための困寒である、 住化を伴う疾患、異常な免疫細胞の苗柱化を伴う疾患、 [44次四37]

類求項32~34のいずれか1項に配戴の困惑。

単設知能の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性 な平滑節細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な複雑芽細胞 の活性化を伴う疾患、異常な清陽組織の活性化を伴う疾 化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、ま たは異常な細胞増殖を伴う疾患の診断のための医薬であ 【翻求項38】 医兼が、感染や炎症を伴う疾患、四緒 る、 酢水項32~34のいずれか1項に配載の医薬。

【柳求項39】 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感

築、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性慢性 肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各 府、外傷性脳損傷または炎症性闘疾患であり、頚常な平 ク、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿 であり、異常な複雑芽細胞の活性化を伴う疾患が時様維 滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭物 症であり、異常な滑質組織の活性化を伴う疾患がりウマ 千柱陽節炎または疫形性陽節炎であり、膵臓り細胞の障 曹を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化 を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化 を伴う疾患がアフルギー、アトパー、 唱見、 花粉症、 気 道過数または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴 う疾患が急性骨髄性白血肉または悪性腫瘍であり、神経 **価間の間面に魅力へ疾困がアルッパイマー依果だは最自** 種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショッ 性脳疾患である、肌水項37または38配載の医薬。

伴う疾患、異常な平滑節細胞の分化増殖を伴う疾患、異 ポリペプチドを用いることを特徴とする、感染や炎症を 常な猿雉芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な瀋陽風は蛇の 活性化を伴う疾患、膵臓β細胞障害を伴う疾患、異常な 破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化 を伴う疾患、異常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞 の障害に基づく疾患の治療および/または予防のための 医薬のスクリーニング方法。

Ry、HIV感染、使性B型肝炎に代表される活動性便性 肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各 【胡求頃41】 昭杲や炎症を伴う疾患が、微生物感 **頽筋脊軽炎、うっ血性心不全、エンドトキシンショッ** 

**ク、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿** 府、外傷性脳損傷または炎症性腱疾患であり、異常な平 滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭物 であり、異常な繊維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺線維 症であり、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマ **子住間節炎または変形柱間節炎であり、膵臓β細胞の**障 害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化 を伴う疣患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化 **を守っ我倒がアフルボー、アトパー、警息、花粉銀、女** 道過吸または自己免疫疾患であり、異常な問胞増殖を伴 う疾患が急性骨髄性白血肉または悪性腫瘍であり、神経 笛配の音句に越力へ新断がアラシミノを一度やたら観目

性脳疾患である、静水項40記載の医薬のスクリーニン

**【樹求頃42】 🏥 数項40または41配数のスクリー** 

ニング方法により得られる、請求項1~3のいずれか1

【柳末頃43】 精末頃30配載の方法により得られる 権状以1~3のいずれか1以に記載のポリペプチドをコ ードする DNAのプロモーター領域および転写制御領域 を用いることを特徴とする、感染や炎症を伴う疾患、舅 格な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な揉維芽細 **疾鬼、膵臓β細胞障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活** 質常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞の障害に基づ **酌の活性化を伴う疾患、異常な滑頭組織の活性化を伴う** く疾患の治療および/または予防のための医薬のスクリ 性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、 頃に配載のポリペプチドに特異的に作用する医薬。

兇、HⅠV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性慢性 肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛風、各 ク、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性糖尿 病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平 滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄 であり、異常な複雑芽細胞の活性化を伴う疾患が肺線維 症であり、異常な滑駒組織の活性化を伴う疾患がリウマ チ性関節炎または変形性関節炎であり、膵臓β細胞の瞳 善を伴う疾患が勧尿病であり、異常な破骨細胞の活性化 を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化 【別求項44】 感染や炎症を伴う疾患が、微生物感 種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキツンショッ **を伴し疾患がアファギー、アトパー、い恩、 花粒信、** 

ニング方法により得られる、請求項1~3のいずれか1 特徴とする、創水項1~3のいずれか1項に記載のボリ 【精求項45】 請求項43または44配載のスクリー 【趙求項46】 精求項21配配の抗体を用いることを 項に記載のポリペプチドをコードするDNAのプロモー ター領域および転写制御領域に特異的に作用する医薬。 **ペプチドの兜板学的被出在。** 

【楠求項47】 精求項21記載の抗体を用いて、精求 項1~3のいずれか1項に配載のポリペプチドを検出す ることを特徴とする免疫組織染色法。 ペプチドをコードするDNAの航母もしくは翻訳を啓覧 特徴とする、精水項1~3のいずれか1項に配載のポリ または促進する物質をスクリーニングする方法。

ポリペプチドをコードするDNAの発現が一部または完 【請求項49】 請求項1~3のいずわか1項に配配の

S

全に抑制されているノックアウト非ヒト動物。

特開2001-352986

€

ポリペプチドの有する活性が一部または完全に抑制され 「簡末項50】 間求項1~3のいずれか1項に配配の ているノックアウト非ヒト動物。

[簡求項51] 額求項1~3のいずれか1項に記載の のいずれか!単に記載のポリペプチドのNF-×B泊井 化に対してドミナントネガティブ活性を有する変異体ポ ポリペプチドを用いることを特徴とする、酪状項1~3 りんプチドのスクリーにング方法。

【楠求項52】 - 楠求項51配敷のスクリーニング方法 により得られる、糖状項1~3のいずれか1項に配載の ポリペプチドのNFー×B陪性化に対してドミナントネ ガティブ活性を有する変異体ポリペプチド。

【簡求項53】 静求項52配数の変異体ポリペプチド をコードするDNA。 【情状現54】 間状現1~3のいずれか1項に配配の のいずれか!頃に記載のポリペプチドのNF-×8活件 化に対して眩活性化を上昇させる変異を有する変異体ポ ポリペプチドを用いることを特徴とする、糖求量1~3 しんプチドのスクリーリング七符。

【樹来項55】 - 創水項54配配のスクリーニング方法 のポリペプチドのNF-xB活住化船が上昇した変数体 により取得される、創求項1~3のいずれか1項に配載

【精求項56】 請求項55配載の変異体ポリペプチド ようんしゃで

ED-FTSDNA. 【発明の詳細な説明】

[0000]

道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴

う疾患が急性骨髄性白血病または駆性腫瘍であり、神経 **哲智の写着に 親力へ 叙色がア ラッパイヤー 依または 協自** 性脳疾患である、請求項43配載の医素のスクリーニン

ド、骸ポリペプチドをコードするDNA、鮫DNAをベ 体DNAを保有する形質転換体、数形質転換体を利用し た餃ボリペプチドの製造法、鮫DNAより得られるオリ ゴヌクレオチドを用いた該DNAの発現量と変異の解析 法、欧ポリペプチドを認識する抗体、胶抗体を用いた免 佐組織発色法、 鮫ポリペプチドに欠失・抑入・ 国校等に より変異を導入した活性上昇改変体、散ポリペプチドに ガティブ変異体、胶ポリペプチドの活性を変動させる化 化合物のスクリーニング法、数DNAの転写を明るプロ [発明の属する技術分野] 本発明は、新規なポリペプチ クターに組み込んで得られる組換え体DNA、酸組換え 欠失・挿入・団換等により変異を導入したドミナントネ 合物のスクリーニングは、岐DNAの発現を変動させる モーターDNA、黙プロモーターDNAによる転耳の効 **率を変動させる化合物のスクリーニング法、これちのス** クリーニング法により得られる化合物、および核DNA を欠損または変異させたノックアウト動物等に関する。

性鎖 (1g Hight chain) 遺伝子の発現にかかわるエンハ v B)は、1986年にB相間における免疫グロブリン 【従来の技術】nuclear factor-kappaB(以下、NFー ンサーに結合する転び因子として固定された(Gell. 4

間間で一般に誘導されてくるNF-xBは、p50とR 複数の分子のヘテロダイマーで構成されており、多くの c I Aのヘテロダイマーと考えられる (Nol. Cell. Blo I x Bの存在も明らかとなっており、I x Bは、無刺激 時にはNFー×Bと複合体を形成しており、NFー×B の抜移行シグナルをマスクすることにより、抜移行を抑 柳している (Science, <u>242</u>, 540-546 (1988)、Gell. <u>g</u> <u>5</u>, 1281-1289 (1991)、Gell. <u>68</u>, 1109-1120 (1992)、E NBO J., 12,3893-3901 (1993), Cell, 78, 773-785 (19 94), Cell, 87, 13-20 (1996)]。 関唐與死因子 (以 .. 12, 674-684 (1992))。NF-×Bを制御する因子 F、TNFーα)等で細胞を刺激すると、LxBは後述 するシグナル伝達分子により32ねよび36番目のセリ **傚々な遺伝子発現を誘導するようになる(Cell,<u>80</u>. 529** ンがリン酸化、核いてユビキチン化され、プロテアンー \* Bは核への移行が可能となり、エンハンサーを持った Aによって分解される。1×Bが分解されると、NF--532 (1995), Cell. 80. 57 3-582 (1995)) .

【0004】NF-×Bを活性化する物質あるいは刺激 8)、インターロイキン2 (以下、11-2)、白血体 阳止因子 (以下、11F)等)、丁田間マイトジェン フォア)、B価粒マイトジェン(抗!gM抗体、an(I—CD40)、ロイコトリエン、リボ多種(以下、L P S) 、ホルボールミリステートアセテート(以下、P イルス(以下、HIV-I)、ヒトT価配白血依ウイル (抗原制後、フケチン、抗T価間フセプター抗体、抗C MA)、寄生体感染、ウイルス感染(ヒト免疫不全症ウ x、HBX、EBNA-2、LMP-1等)、DNA缺 EBV)、サイトメガロウイルス(以下、CMV)、班 **酤へどくスクイルスⅠ(以下、HSV-1)、ヒャヘル** ペスウイルス6 (以下、HHV-6)、ニューカッスル ぼウイルス(以下、NDV)、センダイウイルス、アデ ロヘキシミド)、蝦外県、放射線、酸化ストレス等が知 511703 (Blochemica et Blophysica Acta, 1072, 6 | Lーーロ)、インターロイキン | 角(以下、| Lー| D 2杭体、抗CD 3杭体、抗CD 2 8杭体、CBイオノ 基物質質、 ダンパク質のボインドアター類 (例えばツク 3-80 (1991), Annu. Rev. Cell Blol. 10. 405-455 (19 として、サイトカイン(TNFーa、随係境死因子β (以下、TNF-B)、インターロイキン1a (以下、 ノウィルス等)、ウイルス盛物(二本線RNA、Ta ス I(以下、HTLV-I)、B型肝炎ウイルス(以 下、HBV)、エプスタインーパールウイルス(以下、

【0005】また、NFー×Bの活性化により誘導発現 される分子としては、(1)炎症反応・免疫応答に関る 分子群、 (2) アポトーシスの質制に関る分子群、

(3) 発生・分化に関る分子群、 (4) ウイルスに関す

る分子群等が知られており(Blochemica et Blophysica Acta, 1072, 63-80 (199 1), Annu. Rev. Cell Biol. 10. 405-452 (1994)] 、 誘導発現は多岐にわたってい

ンターロイキン3(以下、1 L – 3)、インターロイキン6(以下、1 L – 6)、インターロイキン8(以下、1 L – 8)、インターロイキン8(以下、1 L – 1)、インターロイキン1 2(以下、1 L – 1 TNF-a、TNF-β、インターフェロンβ
 以下、IFN-β)」、細胞増殖因子(マクロファー ジコロニー創版因子(以下、M-CSF)、製粒はマク 数粒球コロパー営被因子(以下、GICSF))、 レセ プター (インターロイキン1レセプター (以下、11~ a (以下、1 L — 2 R a) 、免疫グロブリン k 転鎖 (以 過合抗原 (以下、MHC) クラス1, 11、β2-ミク ログロブリン)、接着因子 [endothelial leucocyte ad 11 adhesion molecule-1(以下, VCAN-1), intercellula 語かンパク質(白雀アミロイドA 哲説タンパク質、アン ギオテンシノーゲン、補体因子B、補体因子C3、補体 因子C4)、誘導型NO合成酵素(以下、INOS)、 皮細胞成長因子受容体(以下、VEGF-R2)、転写 18) アンタゴニスト、インターロイキン2レセプター F、IgーĸーLC)、T細胞レセプターβ、主要組織 hesionmolecule-1(以下,ELAM—1), vascula r ce インターフェロン関節因子(以下、IRF-1))、ビ ザル免疫不全症ウイルス(以下、SIVmac)、CM 40)、アデノウイルス)等が知られている(蛋白質核 ロファージコロリー包製因子(以下、GM-CSF)、 r adhesion molecule-1(以下、I C A M-1)]、急性 シシロギキンゲナーゼ2 (以下、COXー2)、 何如広 メンチン、ウイルス(HIVー1、HIVー2、アカゲ V、HSV-1、アカゲザルウイルス40(以下、SV 【0006】虧導発現される分子として、具体的には、 母子 (c−Rel, p105, l x − a, c − My c, #41542 (11-1a, 11-1B, 11-2, 校群集, 41, 1198-1209 (1996)]。

る。TNF-aからの活性化シグナルにおいては、TN Fレセプター(TNFRIまたはTNFR2)、TNFre ceptor-associate d death domain protein(以下, TR 出されている。 (EWBO J.. 14. 2876-288 3 (1995), Sc 9. 1586-1597 (1995), Cell, 84, 853-862 (1996), Nat は、TNF-aねよびIL-1について解明が造んでい P), NF- x B- Inducting kinase (以下, NIK), Ix B. IKKy (NEMO)), IKK-co aplex-associate ADD), TMR-associated factor-2 (以下, TRAF d protein (以下、IKAP)等が活性化分子として見 ience, 267, 1485-1489 (1995), GENES & DEVELOPMENT, Bkinase (以下, ΙΚΚ) (ΙΚΚα, ΙΚΚ 【0007】NF-kB活性化に関するシグナル伝達 ure, 388, 548-554 (1997), Cell, 90,373-383 (199 2)、receptor interacting protein (以下, R i

7), Science, 278, 860-866 (1 997), Science, 278. 8 66-869 (1997), Cell, 91, 243-252 (1997), Nature, 3 25, 292-296 (1998)) a

(以下, IRAK) TNF receptor-associated factor 6 は、1L-1 recptor 1(以下、1 L — 1 R I)、1L-1 rec F, TAB1), Transforming gro wth factor- β-act P) , Myd88, IL-1 receptor-associated kinase Ivated kinase 1(TAK1)等が活性化分子として見出 されている (Science, 270, 2008-2011 (1995), Natur (以下、TRAF6)、TAKI binding protein 1 (以 [0008] | Lー!からの活性化シグナルにおいて eptor accessory protein (以下、11-1RAc 398, 252-256 (1999)) ,

10009】 一方、NF-×Bをリン酸化する酵素 (N F-x Bキナーゼ)がNF-x Bシグナルの増強に関わ っているとも考えられてきた(J. Biol. Chem. <u>268</u>, 26 以上のように、NF - x Bの活性化には非常に多くの分 子が関与していることは知られているが、固定された全 ての分子の役割が解明されているわけではない。 紫外線 は、NFーxBの活性化に関わる分子は、ほとんど解明 や酸化ストレス等のTNF-aやIL-1以外の刺激で ĸ Bの活性化機構が予想される (Science, 284, 313-31 されていないのが実状である。さらに、Relファミリ 790-26795 (1993), EMBO J. 13, 4597-4607 (1994)) . 一分子の組織特異的発現を見ても、組織特異的なNF-284, 321-325 (1999), Iomunity, 10, 421-429 (199 6 (1999), Science, 284, 316-320 (1999), Science, 9), Nature Genet, 22. 74-77 (1999)) .

いる未知の分子は、生体内にまだ多く存在すると考えら れ、これらの遺伝子を発見し利用することは、依拠の解 大変有用である。前述したNF-xBを活性化する分子 群あるいはNF-xBの活性化によって誘導発現する分 【0010】以上より、NF-×Bの活性化に関わって 子群からもわかるように、NF-×Bは生体内の免疫応 Bの活性化を通して発揮している。また、NFーĸBに より誘導発現する11-1, 11-2, 11-12, T における免疫反応を昂進し、抗腫瘍あるいは抗ウイルス 答の昂遠において非常に重要な役割を担っている。抗腫 ああるいは抗ウイルス活性を有するTNF-aや!L-1 等のサイトカインは、その作用の主要部分をNF-k 明あるいはNFー×Bが関与する疾患の治療にとって、 NF-a, IFN-B等のサイトカインも、生体や組織 活性を有している。

舌性化するポリペプチドおよびそれをコードするDNA Bの活性化が、腫瘍やウイルスを抑制することは周知の 事異であり、生体内あるいは生体の一部組織においてN FTkBの活性を人為的に上昇させることは、免疫応答 の昂進あるいは抗腫瘍・抗ウイルス活性の増強において #常に効果があると考えられる。従って、NF-ĸBを 【0011】このように、奥陽の疾患においてNF-k

**重要な創業おるいは治療ターゲットである。** 

の発見および取得、さらにはNF一kB活性化上昇変異

時間2001-352986

9

体の発見および取得は、抗腫瘍・抗ウイルスをターゲッ トとした医薬において大変有用である。

【0012】一方で、NF-×Bによって誘導発現する 部等されたELAM-1、VCAM-1、ICAM-1 等の接着分子は、白血峡の組織への漫画を促進し、炎症 組織での白血球の集像を再進する [ Not. Cell. Biol. | L-1、| L-6、| L-8、TNF-a準のサイト カインは、炎症性サイトカインとも呼ばれ、これらのサ イトカインによって過度に昂遠された免疫応答が各種疾 畑の原因ともなっている。これちのサイトカインは、マ クロファージ、好中球、リンパは等を活性化し、炎症組 梅において増取の方向に働く。また、NF-xBにより 3)]。 INOSやCOX-2等の財政は、それぞれ一般 化塩素(以下、NO)やプロスタグランディンE2を産 14. 5701 (1994), Wol. Cell. Biol., 14. 5820 (199 4)., Pro. Natl . Acad. Sci USA, 90. 3943 (199 生し、危性炎症や血管の拡張に作用する。

関与する突想全般において、NFー\*Bは、肉塊解明お [0013] すなわち、NF-xBは、Cれらの価配あ 中心的役割を担っていると考えられる。與際に、便性関 節リウマチの資限、クローン病の調智、勉良の肺組織等 では、NFーxBの活性化が報告されている。したがっ 自己免疫疾患、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、移植片対 宿主疾患、インスリン依存性・非依存性糖尿病、外傷性 脳損傷、炎症性腸疾患、败血症、微生物感染等、炎症が るいは分子を介して、急性炎症および慢性炎症において ト、ピフラボー、アトガー、軸吻、抗筋値、軽減過数。 よび治療薬閒発の重要なターゲットである。

【0014】 摘たの配謝では、パーキットリンパ類 (Bu NK相腔リンパ瞳、EBV間連臂格等が、EBVが原因 とされる。特にEBVがコードするlatent membrane pr 箱合が可能で、樹主のNFー×Bを活性化し、不死化に (1998)]。また、成人工細胞白血肉 (adult T-cell leu kemia: ATL) は、HTLV—Iによる感染が原因で あり、特にHTLV-IがコードするTaxが、IxB を活性化し、アポトーシスを阻奪していると考えられる **馬等する各種接着分子は、癌細胞の転移に関与している** し、NFー×Bによるアポトーシス阻害活性やVECF R2を介した血質所生は、癌細胞の増殖に関与してい。 る。以上のように、NF-xBは、俺の分野においても (1997), J. Virology. 69, 2168-2174 (1995), Oncagen への結合あるいはIKKの活性化を通じて、NF-xB otein (以下, LMP 1) は、TRADDやTRAFと e, 18. 7161-7167 (1999), Gene Th erapy, 5,905-912 U. Biol. Chem., 273, 15891-15894 (1999), J. Blo **陽与していると考えられる (EMBO J.. 1<u>6</u>. 6478-6485**  Chem., 274, 34417-34424 (1999))
 NF - x B A rkitt lymphoma)、ホジキン (Hodgkin) 病、T, B,

【0015】さらに、エイズ等、歯以外のNFー×Bを G 女母子として含むウイルス性疾患においても、NFー 報告があり、動脈硬化、再映物等も含め、平滑筋細胞の 代による語物激弱、アポトーシスの哲智等が原因という た、最自性脳疾患等の最由再通筋障害もNF-×B活性 料常な分化問題を伴う疾患の発症にNF-x Bが重要な k Bは肛型な創業あるいは治療ターゲットである。 虫 役割を果たしているとなえられる。

(1995), Scelence, <u>270</u>, 286-290 (1995), Nolecular an 【0016】近年ステロイドの杭政信仰用やアスピリン の抗災症作用等がNFー×Bの阻害によるものであるこ 異剤はない。既存のNFー×Bの阻害に関わるものとし て知られてさた表剤は副作用が強いことや選択性・特異 - \* Bを活住化する析処ポリペプチドは微葉上有用であ d Cellular Biology, 15, 943-953 (1995)), NF-R Bを特異的に阻害するものとしてスクリーニングされた 性が低い等、問題点も多く、強力かつ即作用の少ない新 しい抗災症薬の開発を目的として、NFーxBをターゲ ットにした化合物探索が行われている。以上より、NF り、これらポリペプチドおよびそれをコードするDNA とが明らかにされてきたが (Sceience, 270, 283-286

段、うっ血性心下金、外傷性脳損傷、炎症性腱疾患等の 用、移植片対荷主成暦等の四常な免疫細胞の活性化を伴 非依存性相原病、糸球体胃炎、乾癬、痛風、各種脳脊髓 **原発や技症を伴う疾患、パーキットリンパ腫、ポジキン** 依、各種リンパ腫、成人下細胞白血成、斑性腫瘍等の質 常な細胞増殖を伴う疾患、関節リウマチ、変形性関節炎 韓哲に魅力へ疾患、 アプシスイヤー伝、 スーキソンソ病 中の神祗価値の音響に越力へ疾患、
悲緊眼化・
耳状会神 £. 全身性歧症反応症候群(SIRS∶systemic Infla エイズ等のウイルス性疾患、虚血性脳疾患の神経細胞の 等の治療薬、予防乳および診断剤の探索、開発に有用な ポリペプチド、数ポリペプチドをコードするDNA、数 慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、インスリン依存性 【発明が解決しようとする課題】本発明は、アレルギ 一、アトパー、 監局、 花形信、 気温過数、 自印免疫疾 **も疾患、エンドトキシンショック、改血症、微生物感** 等の資常な環境芽細胞や滑風組織の活性化を伴う疾患、 の平滑筋粗粗の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器不 mantory response syndrome)、成人呼吸的追症候群 (ARDS : adult respiratory distress syndrone)

8 【視題を解決するための手段】本籍明备らは、上記問題 ヘプチドの箔在上昇投資(4、販ボリペプチドのドミナン トネガティブ度異体、およびこれらの利用法を提供する

を解決するべく鋭意検討を行った結果、新規なアミノ酸 をコードするDNAを取得することに成功し、本発明を 配列を含むNF-x Bの活性化を促す因子および酸因子 完成させるに至った。即ち、本発明は以下の(1)~

【0019】(1) 配列番号1~5のいずれかで扱さ れるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列 をなするポリペプチド。

(54)に関する。

(2) 配列番号1~5のいずれかで復されるアミノ酸 配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列において1以 ミノ酸配列からなり、かつN Fー x Bの活性を上昇させ 上のアミノ酢が欠失、間換および/または付加されたア る活性を有するポリペプチド。

れるアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列 と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、か 【0020】(3) 配列番号I~5のいずれかで扱き ONFーk Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプ

(1) ~ (3) のいずれか一般に配義のポンペ 74FED-FFBDNA. €

(5) 配列番号6~10のいずれかで投される塩基配 列を有するDNA.

> の取印が求められてきた。 [0017]

(4) または (5) に配載のDN NAであり、かつ転写因子NF-xBの活性を上昇させ Aとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするD (0021) (6)

(4) ~ (6) のいずれか!項に配載のDNA る活性を有するポリペプチドをコードするDNA。 3

(4) ~ (6) のいずれか1項に配載のDNA をベクターに組み込んで得られる組換え体ベクター。 (8)

と相同な配列からなるRNAをベクターに組み込んで得 られる組換え体ベクター。

【0022】(9) RNAが1本鎖である(8)配載 の題数え体ベクター。

(10) (1)配敷の阻換え体ベクターを保存する形 西东校体。

**抱、および昆虫細胞からなる群より選ばれる形質転換体** (11) 形質免疫体が、微生物、動物細胞、植物細 である、(10)配配の形質転換体。

(12) 微生物が、Escherichia属に属する微生物で ある、(11)記載の形置院校拝。

一マ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザ 【0023】(13) 動物細胞が、マウス・ミエロー マ価値、ラット・ミエローマ価値、マウス・ハイプリド IMーI組物、ヒト胎児腎臓細胞なよびヒト白血疾細胞 から選ばれる動物細胞である、(11)配戴の形質転換 小牙頭細胞、Namalwa細胞、Namalwa K

> DNAのアンチセンスDNA/RNA、成DNAを用い た遺伝子治療、肢ポリペプチドを認識する抗体、核ポリ

細胞から選ばれる昆虫細胞である。(11) 記載の形質 (14) 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巣 価値、<u>Irichoplusia ni</u>の卵巣価胞ねよびカイコの卵巣

のポリペプチドをコードするDNAの変異を検出する方

**感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の** 分化増殖を伴う疾患、異常な複雑芽細胞の活性化を伴う 疾患、異常な清膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓り細胞 **粗、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、または異常な** 細胞増殖を伴う疾患を検出するために用いる。 (23) の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾 ~(26)のいずれか1項に配載の方法。

【0030】(28) 奶果や淡痘を伴う疾患が、微生 物感染、HIV感染、慢性B型肝炎に代表される活動性 使性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛 風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不全、エンドトキシンシ ョック、敗血症、移植片が指生疾患、インスリン依存性 な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再 狭窄であり、異常な協維芽細胞の活性化を伴う疾患が肺 標準虚であり、異常な滑駒組織の活性化を伴う変更がり ウマチ性関節炎または変形性関節炎であり、膵臓β細胞 住化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活 糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性関疾患であり、異常 の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活 億、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増 性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉 殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または駆性腫瘍であ 9

る、(27)記載の方法。 【0031】(29) (4)~(6)のいずれか1項 ドを用いることを特徴とする、(1)~(3)のいずれ に配載のDNAまたは (22) 配載のオリゴヌクレオチ か!項に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写 またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(30) (4)~(6)のいずれか1項に記載のDN とを特徴とする、(1)~(3)のいずれか!項に配載 のポリペプチドをコードする DNAのプロモーター領域 A または(2 2)記載のオリゴヌクレオチドを用いるこ

[0032] (31) (1)~(3)のいずれか1項 および転写制御領域を取得する方法。 に記載のボリベブチドを合む、取業。

(4) ~ (6) のいずれか!現に配配のDN A、または (8) 若しくは (9) のいずれか1項に記載 の組換え体ベクターを含む医薬。 (35)

(22) 記載のオリゴヌクレオチドを合む図 (21) 記載の抗体を含む医薬。 (33)

ポリペプチドが免疫気活作用を 有することを特徴とする(31)配載の既薬。 (0033) (35)

免疫域活作用を介して抗腫瘍活性および抗ウ

(31) 医薬が、感染や炎症を伴う疾患、胃精な平舟 筋細胞の分化増殖を伴う寒患、異常な標准芽細胞の活性

8

特開2001-352986

形質転換体が、非ヒトトランス ジェニック動物またはトランスジェニック植物である、 (10) 記載の形質系数4。 [0024] (15)

(10)~(14)のいずれか1項に配載の **せ, 数倍量物から数ポリペプチドを採取することを特徴** 形質危疫体を倍地に培養し、培養物中に(1)~(3) のいずれか1項に配載のポリペプチドを生成、整備さ とする、数ポリペプチドの製造方法。 【0025】(17) (1)配配の組換え体DNAを (1)~(3)のいずれか」項に記載のポリペプチドを **散動物中に生成、蓄積させ、散動物中より数ポリペプチ** ドを採取することを特徴とする、欧ポリペプチドの製造 保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、

(18) 蓄積が動物のミルク中であることを特徴とす る、(17)配載の製造法。

[0026] (19) (7)配配の組換大体DNAを (3) のいずれか | 項に配載のポリペプチドを設袖物中 保有するトランスジェニック植物を栽培し、(1)~

に生成、蓄積させ、駁植物中より数ポリペプチドを採取 (20) (4)~(6)のいずれか1項に記載のDN Aを用い、jn vitroでの転写・翻訳系により、該DNA のコードするポリペプチドを合成することを特徴とす することを特徴とする、骸ポリペプチドの製造法。

【0027】(21) (1)~(3)のいずれか1項 に配戴のポリペプチドを認戴する抗体。 る、数ポリペプチドの製造法。

Aの塩基配列中の連続した5~60塩基からなる配列を 有するオリゴヌクレオチドまたは骸ヌクレオチドと相補 (22) (4)~(6)のいずれか1項に配載のDN 的な配別を有するオリゴヌクレオチド。

(23) (4)~(6)のいずれか!現に配配のDN む、(1)~(3)のいずれか1項に記載のポリペプチ A または(2 2)配載のオリゴヌクレオチドをプローブ として用いてハイブリダイゼーションを行うことを含 ドをコードするDNAの発現を検出する方法。

・リアクションを行うことを含む、 $(1) \sim (3)$  のい 【0028】(24) (22) 記載のオリゴヌクレオ チドをプライマーとして用いたポリメラーゼ・チェイン ずれか!頃に配載のポリペプチドをコードするDNAの 発現を検出する方法。

(4)~(6)のいずれか1項に記載のDN Aまたは (22) 配載のオリゴヌクレオチドを用い、ハ イブリダイゼーション依により、(1)~(3)のいず たか1 項に記載のポリペプチドをコードするDNAの姿 (52)

「テラことを含む、(1) ~ (3)のいずれか1項に記載。 チドを用い、ポリメラーゼ・チェイン・リアクションを 【0029】(26) (22)配成のオリゴヌクレオ

時間2001-352986

化を伴う校別、関帯な確認組織の活性化を伴う校園、脚盤の間的の種を作り校園、関係な股骨間間の活性化を作う疾犯、関帯な免疫間間の活性化を伴う疾犯、関係な関係的関係の関係など、は、対し、大きない、は、は、 コー (3 + 0) のいずれが「現所には、 は、 3 + 2 + 0) をは、 13 年間には、 13 + 0) のいずれが「現に配めて、 (3 5 - 2) - (3 + 0) のいずれが「現に配めの影楽しる。 (3 5 - 2) - (3 + 0) のいずれが「現に配物の影楽」。

【0035】 (39) 感染や淡症を伴う疾患が、微生 物のR. HIV原の、便性B型肝炎に代表される活動性 四、各種脳脊髄炎、もっ血性心不全、エンドトキシンツ ョック、敗血症、移植片対宿主疾患、インスリン依存性 間段内、外傷性脳清傷虫たは炎症性間疾患であり、異常 な平滑筋細胞の分化増殖を伴う皮脂が動脈硬化または再 映布であり、図常な様雄等細胞の活性化を伴う疾患が肺 り、神経問題の障曹に基づく疾患がアルツハイマー位ま 類様値であり、異常な滑騰組織の活性化を伴う疾患がり ウマチ性関節炎または食形性関節炎であり、膵臓 β 細胞 の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活 性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の汚 位、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増 たは戯血性脳疫用である、(31)または(38)記載 慢性肝炎、慢性関節リウマチ、糸球体腎炎、乾癬、痛 強を伴う政策が急性骨髄性白血肉または駆性腫瘍であ 在行を守む釈函なアファボー、アトパー、軸宮、右形

[0036](40)(1)~(3)のいずれか!項に記載のボリペプチドを用いることを特徴とする、感染や女症を伴う疾患、関本な平衡節動物の分化が関条件う解析、関本な機能を作う疾患、関本な機関の活性化を伴う疾患、関本な機能関節を作う疾患、関本な機能関係化を体う疾患、関本な機能関係を伴う疾患、関本な機能が強を作り疾患を関める活性にを伴う疾患、関本な機能が強を伴う疾患を持ち病的の活性にを伴う疾患、関本な機能が強を伴う疾患を持ちのための误義のスクリーニング方法。

[0037] (41) 応発や校信を伴う疾患が、衛生物域、、 物性が、 世柱間的リケマ・糸球体質炎、 水道、 関、各種間脅地域、 うっ血性心不全、 エンドトキシンン ョック、 吹血症、 移動け対击性型、 インスリン族存在 解尿病、 対値性調道の主には反性に関係部であり、 取業 な平穏節間的分化性解を伴う疾患が動脈硬化生たは 致育であり、 取業な機能等面の活性化を伴う疾患が は独立であり、 取業な機能等面の活性化を伴う疾患が は独立であり、 取業な機能等面の活性化を伴う疾患が特

【のの38】(42) (40) または(41) 配能のスクリーニング方法により得られる、(1) ~(3) のいずれか!項に配能のポリペプチドに特別的に作用する医薬。

(43) (30) 配載の方法により得られる(1) ~ (3) のいずれか1項に配載のボリペプチドをコードするDNAのグロモーター環境はまたび毎月制御報報を用いることを存在とする、原染や效症を伴う疫患、関帯な精発性間の合性化を伴う疫患、関係なイラ炎部、関係なイラ疾患、関係な保護の活性化を伴う疾患、関係な保護の活性化を伴う疾患、関係な保証を指して活性の経過の活性化を伴う疾患、関係な保証を指して発生の、関係な保証を指して表現を開助の活性化を付う疾患、関係な保証を促進されて表現に対策を関の言意に基づく疾患の治療なよびが生きないませんが方法を表現されて表現を関係にありるというとない。

【のの39】(44) 成発や效症を伴う疾患が、衛生物に発、HIVの以、健性の監肝炎に代表される活動性健性肝炎、健性関節リケマチ、糸球体腎炎、乾燥、痛風、各種脳脊髄炎、シュ血柱心不全、エンドトキンンシ

【0040】(45) (43) または (44) 記憶のスクリーニング方法により得られる。 (1) ~ (3) のいずれか! 項に記憶のポリペプチドをコードするDNAのプロモーター領域ねよび転写制御領域に特異的に作用する磁薬。

(46) (21) 配載の抗体を用いることを特徴とする、(1) ~ (3) のいずれか1項に配載のボリペプチドの免疫学的検出法。

(41) (21) 記載の抗体を用いて、(1) ~(3) のいずれか1項に配載のポリペブチドを検出することを特徴とする免疫組織染色法。

【0041】(48) (21) 配館の抗体を用いることを特徴とする、(1) ~(3) のいずれか!現に配配のがリスプチドをコードするDNAの転写もしくは翻訳を抑制まれば信はする物質をスクリーニングする方法。(49) (1) ~(3) のいずれか!項に配範のボリベプチドをコードするDNAの発現が一部または完全に抑制されているノックアウト非と上動物。

(50) (1)  $\sim (3)$  のいずれか!現に配義のボリペプチドの有する活性が一部または完全に抑制されているノックアウト非ヒト動物。

【0042】(51) (1)~(3)のいずれか1項 に配戴のボリペプチドを用いることを特徴とする、

たERWOンソントアインのこの大が対してあって、 (1) ~(3) のいずれか!現た信仰のよりペインチャの NFーx B倍性に対してドスナントネガティが結構を 育する数数体ポリペプチャのスクリーニング方法。

(52) (51) 配飯のスクリーニング方法により取得られる。(1)~(3)のいずれか!毎に記飯のボリペプチドのNFー×8活性化に対してドミナントネガティブ活性を有する窓質体ポリペプチド。

[0043] (54) (1) ~(3) のいずれか! 項に配のポリペプチドを用いることを特徴とする。

(1)~(3)のいずわか! 現に配載のポリペプチドの NF-×B活性化に対して統符性化を上昇させる変図を 有する変図休光リペプチドの

(5.5) (5.4)配載のスクリーニング方法により取得される。(1)~(3)のいずれか!項に配載のポリペプチドのN F − x B 语性化能が上昇した変異体ポリペプチド。

(56) (55) 記載の変異体ポリペプチドをコード するDNA.

[0044]

【発明の英緒の形態】本発明のポリペプチドとしては、 1. 配列番号1~5のいずれかで投されるアミノ権配列 からなる群より遺ばれるアミノ様配列を有するポリペプチド 2.配列番号1~5で載されるアミノ斡配列からなる群より遺ぼれるアミノ韓配列において1以上のアミノ韓が欠失、電球および/または付加されたアミノ韓配列からない。カンNF-kBの活性を上昇させる活性を打する

3.配別番号1~5のいずれかで喪されるアミノ韓配別からなる群より選ばれるアミノ韓配別と60%以上の相同性を打するアミノ韓配別を含み、かつNF~kBの活性を上昇させる活性を有するポリペプチドを挙げること

【0045】上記のアミノ酸配列を有するボリペプチドにおいて1以上のアミノ酸が決失、電換および/生たは 何加されたアミノ酸配列を有するボリペプチドは、Mole cular Cloning。A Laboratory Manual、Second Editio n. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998(以 下、モレキュラー・クローニング類2版と略す)、Curr ent Protocols In Molecular Blology、John Willey & Sons, 1997 (以下、カレント・プロトコールズ・

Acids Research , 10, 6487, (1982) , Proc. Natl. A

ムン・ホフチュレー・パイギロジーが唱す)、Nucleic

【0046】また、本発明のポリペプチドとしては、配別番目~このいずれかに配慮のアミノ酸配列と60%以上の相同性を打するアミノ酸配列を含む。配列番号・2のいずれかに配慮のアミノ酸配列を含む。配列番号・AST U. Mol. 3 Not. 215、403 (1890) シギA STA (Methods in Euzymology. 183. 63-69) 等の解析ソフトで、デフォルト (切用配定)のパラメータを用いて計算したときに、少なくともの%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは30%以上、特に好ましくは35%以上、積6分ましくは35%以上、特に対ましくは35%以上、特に対ましくは35%以上、特に対ましくは35%以上、特に対ましては35%以上、最6分ましくは35%以上、140分割とい。

60047] 本発明のDNAとしては、 1.額採明 1~3のいずれか一項に配数のポリペプチド

をコードするDNA 2. 鷸状項4配館のDNAとストリンジェントな条件下でパイプリダイズするDNAであり、かつ転び田子NF エパイプリダイズするDNAであり、かつ転び田子NF -×Bの活性を上昇させる活性を有するポリペプチドを

コードするDNA 3.配列番号6~1.0のいずれかで投される塩基配列を 有するDNAを挙げることができる。 【0048】一般に1つのアミノ酸に対して複数値の適 応明号が存在するため、配列部号6~1ののいずれがと は関なる世島配列を有するDNAであっても本発明のボ リベブチドをコードしていは本発明のDNLに合まれ る。ストリンジェントな会件下でいっパブリダイズするD NAとは、例えば配列番号6、7、8、9年だは10下 設される塩島配列を有するDNA等の本界明のDNA店

たはその一部の形式をプローブとした、コロバー・ハイ プリダイボーション弦、プラーク・ハイブリダイボーツ ョン弦あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション 法等を用いることにより**穏られるDNAを意味し、具体** 的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定 の塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーシ ョンを行った後、0. 1~2倍濃度の5.5 C溶液(1倍 適度のSSC溶液は、150mmo 1 / 1塩化ナトリケ **行したフィラターを用いて、0.1~1.0m01/1** を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することによ り同定できるDNAを挙げることができる。 ハイブリダ ギロジー、D NACloning 1: Core Techniques, A Practi カレント・プロトコールズ・イン・モレキュサー・バイ 4. 15 mmol/lクエン酸ナトリウムよりなる) イゼーションは、ホワギュシー・クローコング数2版、 cal Approach. Second Edition, Oxford University. 995等に配載されている方法に準じて行うことができ

【0049】ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的 に、配列部号6、7、8、9または10で設される協島 には、BLASTやFASTA苺の解析ソフトで、ヂフ **ォルト (初期配定) のパラメータを用いて計算したとき** 好ましらは70%以上、より好ましくは80%以上、さ 上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNA 配列と少なくとも60%以上の相両性を有するDNA、 らに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以 を挙げることができる。

【0050】以下,本籍明を詳細に説明する。 I. 本発明のDNAの認識

(ACPC) 法 (Analytical Blochemistry, 162, 156 (19 もよい。組織から全RNAを問製する方法としては、チ (Wethods In Enzymology, 154, 3 (19 87)]、酸性 チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロフォルム また、全RNAからpolyA・RNAとしてmRNA を開製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロ **一スカラム荘(モレキュラー・クローニング類2版)等** が挙げられる。さらに、FastTrack mRNA Isolation Kit Kit (Pharmacia社製) 等のキットを用いることによりm を用いてもよいし、以下のごとくヒト組織から弱製して ヒトmRNAは、市販のもの(例えば、Clontech社製) (invitrogen社製), Quick Prep mRNA Purification 87)、現験限学、9, 1937 (1991)] 等が挙げられる。 オシアン酸グアニジンートリフルオロ酢酸セシウム法 RNAを開製できる。

【0051】 阿製したヒト植植m RNAからc DNAサ イブラリーを仲製する。cDNAライブラリー作製法と **したは、ホフキュセー・シローコング狂2板、セフント** れた方法、あるいは市服のキット、例えばSuperScript 一、A Laboratory Manual, 2 nd Ed., 1989等に記載さ ・プロトコージズ・イン・ホフキョルー・スイギロジ

製, AgtiO, Agtil (DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985) )、ATriplEx (Clontech社 影、 A ExCell (Pharmacia社製)、 pT7T318V (Pharmac Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Clo 【0052】cDNAライブラリーを作製するためのク ローニングベクターとしては、大脳菌K 1 2 株中で自立 2) ), pBluescript II SK(+) (Nucleic Acids Researc 17. 9494 (1989) ] , Lambda ZAP 11 (STRATAGENE社 ning (Life Technologies社製) 、ZAP-cDNA Synthesis 複製できるものでおれば、ファージベクター、プラスミ la社製)、pcD2 (Mol. Cell. Blol., 3, 280 (198 3) )およびpUCl8 (Gene, <u>33</u>, 103 (1985) ) 等を挙げ Express (STRATAGENE社製, Strategles, 5.58, (199 ドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP (it (STRATAGENE社製)を用いる方法等が挙げられる。 ることができる。

【0053】 宿主微生物としては、大腸菌に属する微生 W. Strategles, 5. 81 (1992) ]、Escherichia coll 物であればいずれでも用いることができる。具体的に Escherichia coli XLI-Blue NRF' (STRATAGENE#

<u>chia coli NN522 (J. Noi. Biol., 166, 1 (198</u> 3) ), <u>Eshe richia coli R802 (J. Noi. Biol., 16, 1</u> C600 (Genetics, 39, 440 (1954) ), Esherichia co 11 Y1088 (Science, 222, 778 (1983) ), Escherichi acoli Y1090 (Science, 222, 778 (1983) ), Escheri 18 (1966) ) . Escherichia coli JN105 (Cene, 38. (1985)] 等が用いられる。

に、智野らが開発したオリゴキャップ法 (Gene, <u>138</u>, 1 下げ、なるべく完全是 c DNAを効率よく取得するため 【0054】このcDNAライブラリーを、そのまま以 下の解析に用いてもよいが、不完全畏cDNAの割合を リーの作製法, 羊土社 (1994)] を用いて朝製した。D 【0055】作製したcDNAライブラリーから各クロ ーンを単語し、それぞれのクローンについて。DNAの 集, 41, 603 (1998)、実験医学, 11, 2491 (1993)、c DNAクローニング, 羊土社 (1996)、遺伝子ライブラ 法、例えばサンガー (Sanger) ちのジデオキシ法 (Pro c. Natl. Acad. Sci. USA, 74.54 63 (1977) ] あるい HABI PRISM377DNA > - OLY OFB losystem社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析する 71. (1994) 、Gene, 200. 149 (1997)、蛋白質核酸醇 塩基配列を未構から、通常用いられる塩基配列解析方 NAライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

ことにより、鮫DNAの塩基配列を決定する。得られた 塩基配列をアミノ酸配列に翻訳することにより、このD NAがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を得るこ

BLAST、FASTA等の相同性解析プログラムを用 k、EMBL等の協議配列データベース中の協議配列と 【0056】また、得られた協基配列をGenBan

いて比較することにより、得られた協善配列が新規な協 基配列かどうか、また得られた塩基配列と相同性をもつ 塩基配列を検索することができる。また塩基配列より得 られたアミノ酸配列をSwissProt、PIR、G enPept等のアミノ酸配列データベースと比較する **栢回在をもつポリペプチド、囲えばシットとは別の生物** ことにより、その協権配列がコードするポリペプチドと 種での相当する遺伝子に由来するポリペプチドや同じよ うな活性や機能をもつと推定されるファミリータンパク 質を検索することができる。

増幅断片が得られた際には、販断片を適当なプラスミド にサブクローニングする。サブクローニングは、増幅断 を設計し、上記のようにして取得した一本鎖cDNAま (Stratagene社製) 、pBluescript II SK(+) (Stratage ne社製)、pDIRECT (Nucreic Acid s Research, 18, 60 【0057】 データベース検索で明らかになった相同道 伝子の塩基配列を基に、眩遺伝子に特異的なプライマー たはcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行う。 片をそのまま、あるいは制阻酵素やDNAポリメラーゼ で処理後、定法によりベクターに組込むことにより行う ことができる。ペクターとしては、pBluescript SK(-) 69 (1990) ) , pCR-Script Amp SK(+) (Stratagene社

劉)、pīrBiue (Novagen社製)、pCRII (Invitrogen社 製)、pCR-TRAP (Genehunter社製)、pNo TAri (5'→3' 【0058】配列番号6~10のいずれかの塩基配列か 社製) 等を挙げることができる。

5なるDNAが一旦取得され、その協善配列が決定され た後は、岐塩基配列の5,端および3,端の塩基配列に **基力にたプライマーを開製し、ヒトまたは非ヒト動物の** 組織または細胞に含まれるmRNAから合成したcDN A あるいはc DNAライブラリーを用いて DNAの増幅 を行うことにより、本発明のDNAを取得することがで

[0059] 生た、配列番号6~10のいずれかの協惠 配列よりなるDNAの全長あるいは一郎をプロープとし て、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞に含まれる ラリーに対してコロニーハイブリダイゼーションやプラ ング第2版)を行うことにより、本発明のDNAを取得 m R N A から合成したc D N A あるいは c D N A ライブ ークハイプリダイゼーション (モレキュラー・クローニ することができる。

DNA、オリゴRNA毎のオリコヌクレギチド、および ホスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社 合成することにより、本発明のDNAを取得することも できる。本発明のオリゴヌクレオチドとしては、オリゴ 核オリゴヌクレオチドの誘導体(以下、誘導体オリゴヌ のDNA合成機 (model 392) 等のDNA合成機で化学 【0060】決定されたDNAの協議配列に基づいて、 クフォチド)体が巻げられる。

レオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド (以下、アンチセンスオリゴダクレオチド) として、既 えば、検出したいmRNAの一部の塩基配列において、

時間2001-352986

 未機関の塩基配列に相当するセンスプライマー、
 未機関の塩基配列に相当するアンチセンスプライマ 一等を挙げることができる。ただし、MRNAにおいて ウラシルに相当する塩基は、オリゴヌクレオチドプライ マーにおいてはチミジンとなる。

【0062】センスプライマーおよびアンチセンスプラ イマーとしては、両者の胎解温度(Tm)および塩基数 60協趣、好ましくは10~50協議数のものが挙げら レオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエ れたもの、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プ スで国換されたもの等が挙げられる (細胞工学, 16, 14 が極端に変わることのないオリゴヌクレオチドで、5~ れる。既導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌク **一ト結合に交換されたもの、オリゴヌクレオチド中のリ** ン散ジエステル箱合がN3.-P5.ホスフォアミデート スとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換さ ロパコルケシッかで国校されたもの、オリゴヌクフォチ ド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで配換され たもの、オリゴヌクレオチド中のシトシンがCー5プロ アニルシトシンで国校されたもの、オリゴヌクレオチド 中のシトシンがフェノキサシン存售シトシン (phenoxaz 協合に突破されたもの、オリゴヌクフォチド中のリボー Ine-modified cytosine) で間換されたもの、オリゴヌ クレオチド中のリボースが2・メトキシエトキシリボー 63 (1997) ] .

【0063】2. 本発明のDNAのNF→x B活性化の

(1) 活性検出に用いる宿主細胞

本発明において、DNAの活性を検出するために用いる 宿主細胞としては、DNAを細胞内に導入できる細胞な 例えば、細菌・古細菌、凝類、菌類、植物、動物等に由 来した細胞が挙げられる。具体的には、下配生物由来の らいかなる組物も用いることができる。数細胞として、 無智が挙げられる。

hococcus 個やSynechocys tis属の配接等が挙げられる。 植物としてはタバコ、アラビドブシス、トマト、ジャガ イモ、ナタネ、ワタ、ダイズ、イネまたはトウモロコシ 【0064】相関・古祖間としてはEscherichia collや Bacillus subtills等が挙げられる。 療気としてはSynec 等が挙げられる。歯類としてはSaccharomyces cerevisi aeやAspergillus nigar等が挙げられる。動物としては 哺乳動物、節足動物等が挙げられる。

ット、モルモットまたはミンク等が挙げられる。具体的 [0065] 昭乳動物としてはヒト、サル、マウス、サ ゾカン・タイプ・カルチャー・コレクション (以下, AI **点は、ヒトの無関としては丁苗配林」=FKal(アメ** CCと略配する)の番号IIB-512の細胞株1、 B細胞株N

8

【0061】 眩オリゴヌクレオチドまたは眩オリゴヌク

(ATCC CRL-16 50)、サル野組配供COS-7 (ATCC C n (ATCC CCL-2) 、別価担係293 (J. Gen. Vlol. 3 n malwa (ATCC CRL-1432)、子白格田智林Hel 8. 59-72 (1977)) 等を用いることができる。ヒト以外 の哺乳動物の細胞としては、サル脊細胞株COSーI

llauster Ovary) 相間は、HO (ATCC CRL-9096, ATCC C CL-61)、マクス細胞株Ba/F3(RIKEN Cell Bank R ることができる。即足動物としては、カイコが挙げられ CB0805) 、マウス細胞体L929 (RIKEM Celi Bank RC 0)、ミンク価粒株MvILu (ATCC CCL-84) 等を用い 5. 月体的引には、Spotkoptera fruglperda S f 9 株やS 「2」株等を用いることができる。治療用タンパク性医 製品や医製品のスクリーニングターゲットとなるDNA の採集が目的の場合は、咱乳動物の細胞、特にヒトの簡 80081)、ラット価値核NRKー49F (ATCC CRL-157 RL-1651)、チャイニーズ・ハムスター卵巣 (Chinease 間を宿主とすることが好ましい。

**主細胞に遺伝子を導入する方法であればどのような方法** 本発明のDNAを宿主細胞に導入する方法としては、信 でも用いることができる。例えば、エレクトロボレーシ ーズ4. (3) 、ワクシニアウィルス法 (年土社 バイオマニュアルシリーズ4, 59) レトロウイルスペクター法 ュアルシリーズ4.16)、リボフェクション法(并土社 ュクション法(年土社 パイポマニュアルシリーズ4.3 ① 、アデノウイルス法(年土社 バイキマニュアルシリ バイオマニュアルシリーズ4, 28)、マイクロインジ (年土社 パイポマニュアルシリーズ4, 74) 毎の公田 リン酸カルシウム法(羊土社 パイオマニュアルシリー ズ4. 13)、DEAEデキストラン法(羊土社 バイオマニ ョン法(本土社 パイオマニュアルシリーズ4, 23)、 【0066】(2) 宿主価悶への遺伝子導入法 の方法を用いることができる。

発明のDNAを取得することができる。NF-xBの活 × Bを活性化できるため、簡配におけるNFー×Bの活 住化を検出することが可能な方法を用いることにより本 本発明のDNAは、細胞で発現させることによりNFー I×Bのリン酸化やユピキチン化をウエスタンプロット り検出する方法が挙げられる。また、さらに効率よく検 モン、各風Greenfluorescent protein (以下、GFP) 法 (年土社 バイオマニュアルシリーズ7. 17g) 移によ 出する方法として、レポーター適低子を用いて検出する せ、βーガラクトシダーゼ、ウロキナーゼ、クロラムフ ュニコールアセチルトランスフェラーゼ、ヒト成長ホル 住化を検出する方法として、以下の方法が挙げられる。 氏写制即領域への結合をゲルシフト法 (単土社 パイオ は、ルシフェラーゼ、ヒト胎盤アルカリ・ホスファター [0068] 例えば、畑畑油出液を用いる方法として、 マニュアルシリーズ 5.107) 等により解析する方法、 方法を挙げることができる。 レボーター遺伝子として [0067] (3) 本発明のDNAを収得する方法

**春をコードする遺伝子を用いることができる。 レボータ** 一選伝子に連結するプロモーターとしては、NFーĸB により転写されうるプロモーターであるならいかなるプ ロモーターも用いることができる。例えば、NF-xB 出すことにより単橋したプロモーターDNA断片、染色 体DNAを御型としてPCR法によって増加することに ター領域を染色体DNAから制限酵素消化によって切り よって得られるプロモーターDNA断片、または核プロ モーターの協島配列を存する合成DNA断片等が挙げら の活性化により発現が制御されている遺伝子のプロモー

[0069] 具体的には、11-1 a、11-1β、1 TNF-a, TNF-B, IFN-B, M-CSF, G ブリン、LAMー1、VCAMー1、1CAMー1、目 1-2, 11-3, 11-6, 11-8, 11-12, C、T田間レセプターβ、MGクラス1、β2-ミクログロ 衛アミロイ FA哲略タンパク質、アンギオテンシノーゲ ン、補体因子B、補体因子C3、補体因子C4、、1NO M-CSF, G-CSF, L-2Ra, 1g-x-L

S, COX-2, VEGF-R2, c-Rel, p10 HIV-2、SIVmac、CMV、HSV-1、SV40、アデノウイルス等のプロモーターやそれちのコン 5. 1 x B a, c - My c, 1 R F - 1, H I V - 1, センサス配列を1個あるいは複数個有した合成プロモー ター等が挙げられる。

ことにより、NF-×Bの活性化を検出できる。あるい 上記プロモーターにフボーター遺伝子を連結した転写コ ニットを作製した後、その転写コニットを宿主細胞の染 色体に組み込んだ細胞株を作製する。この細胞内に本発 明のDNAを発現するユニットを導入し本発明のDNA を発現させた後、レポーター遺伝子の発収量を削定する は、上記プロモーターにレポーター遺伝子を連結した転 写ユニットを作製した後、 核転写ユニットと本籍明のD NAを発現するユニットの二つのユニットを同時に宿主 粗悶に導入し、レポーター遺伝子の発現量を測定するこ 【0070】レポーター遺伝子を用いた検出方法では、 とにより、NFー×Bの活性化を検出できる。

本発明のポリペプチドは、モレキュラー・クローニング 【0071】3. 本発明のポリペプチドの製造

棋2版やカレント・プロトコールズ・イン・モフキュラ バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば 以下の方法により、本発明のDNAを宿主細胞中で発現 させて、製造することができる。

て、散ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さ DNAを適当な発売ペクターのプロモーターの下流に描 **入することにより、粗換えベクターを作製する。眩粗換** えくクターを、販発現くクターに適合した宿主知覧に導 入することにより、本発明のポリペプチドを生産する形 のDNA断片を闢製する。核DNA断片、または全長c [0072] 全長c DNAをもとにして、必要に応じ

Ê

時間2001-352986

質転換体を得ることができる。

きるものであればいずれも用いることができる。発現べ クターとしては、上記宿主細胞において自体複製可能な いしは染色体中への組込みが可能で、 本発明のポリペプ 間、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現で チドをコードする DNA を転写できる位置にプロモータ 【0073】宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細 一を含有しているものが用いられる。

場合は、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含 有してなる組換えべクターは原核生物中で自律権製可能 本発明のポリペプチドをコードする遺伝子、および転写 い。為、ベクターには、プロモーターを制御する遺伝子 【0074】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、 样植配列より構成されたペクターであることが好まし が合まれていてもよい。

【0075】発現ベクターとしては、例えば、paTrp2

(Boehrin ger Mannheim社製)、pBTaci (Boehringer M 製)、pKYP10 (特別昭5 8-110600号)、pKYP200 [Agric 9) ) , pGEL1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 BP-5407) より解製)、pTrS32 (Escherichia coli JW10 9/pTr332 (FERM BP-5408) より研究)、pGHA2 (<u>Escheri</u> <u>chia coli</u> IGHA2 (FER N BP-400) より研究、特別研究60-221091号)、pGKA2 (<u>Escherichia coli</u> IGKA2 (FERN BP -6798) より解製、特開昭60-221091号)、plerm2 (米国 4, pEC400 (J. Bacteriol., 172, 2392 (1990) ), pG 特群第4,686,191号、米国特群第4,939,094号、および米 ーム結合配列であるシャイソーダルガーノ (Shine-Dalga 製), pTrS30 (Escherichia coli JNi09/pTrS30 (FERN 国特群第5,160,735号)、pSupex、pUBIIO、pTP5、pC19 rno)配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6〜) EX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)等 を挙げることができる.発現ペクターとしては、リボソ annheim社製 、pBTac2 (Boehringer Mannheim社製) pKK233-2 (Pharmacia社製)、pSE280 (Invitrogen社 製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社 4) ] , pLSAI (Agric. Bil o. Chem., 53. 277 (198 (1985) ), pBluescript II SK(-) (Stratagene社 ultural. Biological. Chemistry., 48, 669 (198 8塩基)に関節したものを用いることが好ましい。

【0076】プロモーターとしては、宿主細胞中で発現 できるものであればいかなるものでもよい。例えば、吐 ター、Prプロモーター、Trプロモーター等の、大腸菌や pプロモーター (Ptrp)、10cプロモーター、Ptプロモー ファージ等に由来するプロモーターおよび、SP01プロモ ーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等を挙げ に人為的に設計改変されたプロモーター等も用いること ることができる。また、Pirp を2つ直列させたプロモー ター (Pup ×2)、<u>tac</u>プロモーター、lacTプロモータ 一、letlプロモーター (Gene, 44. 29 (1986)) のよう

塩基を固換することにより、目的とするポリペプチドの 【0077】本発明のポリペプチドをコードする部分の ターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配 列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写 生産帯を向上させることができる。本発明の超換えベク 塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、

チア属、パチルス属、プレビパクテリウム属、コリネパ 【0078】宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラ クテリウム層、ミクロパクテリウム層、シュードモナス 届等に属する微生物、例えば、<u>Escherl chia coll</u> XLI・ DHI. Escherichia coli MC1000. Escherichia coli KY3 Blue, Escherichia coli XL2-Blue, Escherichia coli 終結配列を配置することが好ましい。

276. Escherichia coll W1485. Escherichia coll JW10 9. Escherichia coli W3110. Escherichia coliNY49. S ntum ATCC13869, Corynebacterium glutamicum ATCC130 3.2. <u>Microbacterium ammoniaphilum</u> AIGCIS354. <u>Pseud</u> omonnasu sp. D-0110等を挙げることができる。 【0079】組換えベクターの導入方法としては、上記 err atla ficaria, Serratla fonticola, Serratla 119 s. Bacillus amyloliquefacines. Brevibacterium ammo Brevibacterium saccharolyticum ATCC14068, Brevibac terium flavum ATCC14067, Brevibacterium lactoferme 9. Escherichia collimbiol. Escherichia coll No. 4 uefaciens, Serratia marcescens, Baci ilus subtili niagenes. Brevibacterium immarlophilum ATCC14068.

ることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用い (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (197

は、Gene, <u>17</u>, 107 (1982) やMole cular & General G enetics, <u>168</u>, 111 (1979) に配配の方注等を挙げるこ 2) ]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394号)、また とができる。

【0080】酵母を宿主細胞として用いる場合には、発 現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115) 、YEp2 4 (ATCC37051) . YCp50 (ATCC37419) . pHS19, pHS154 を挙げることができる。プロモーターとしては、群母的 株中で発現できるものであればいずれのものを用いても よく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子 一、CAPプロモーター、ADHプロモーター、gallプロモー プロモーター、NFI プロモーター、CUPIプロモーター等 ター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質 のプロモーター、PHO5プロモーター、PCKプロモータ

セス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cere [0081] 宿主細胞としては、サッカロミセス属、ウ リュイベロにセス層、トリコスボロン層、シュワニギミ distae. Schlzosaccharomyces pombe. Kluyveromyce s

lactis, Trichosporon pullulans, Schwamiomyces all

エロプラスト法 (Proc. Matl. Acad. Sci. USA,84, 192 163 (1983)] , (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75. 1 ずれも用いることができ、眩えば、エフクトロポワーツ ヨン法 (Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)) 、スフ 方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればい 9 (1978)] 、酢酸リチウム法 ①. Bacteriolog y. <u>153</u>. nvins等を挙げることができる。 粗換えベクターの導入 929 (1978)) 配載の方法等を挙げることができる。

33(1990)) 、pAS3-3 (特別平2-227075) 、pCDW8 (Nature, 329, 840 (1987)) 、pcDNAI/A mp (Invitrogen社 【0082】動物細胞を宿主として用いる場合には、発 呪くケケーとして、例えば、pcDNAI、pcDN8(フナコツ社 製)、pAGE107 (特別平3-22879:Cytotechnology, 3. 1 观)、pREP4 (Invitrogen社秘)、pAGE103 (J. Biochem Istry, <u>101</u>, 1307 (1987))、pAGE210等を挙げることが

【0083】プロモーターとしては、動物細胞中で発現 できるものであればいずれも用いることができ、例え

CMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共 ホーダー、ファロケイルスのプロホーター、メタロチギ ば、サイトメガロウイルス(CMV)のIE(Immediat ネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、S Rnプロモーター等を挙げることができる。また、ヒト e enrly) 遺伝子のプロモーター、SV40の初類プロ に用いてもよい。

-227075) 、リポフェクション法(Proc. Natl. Acad. S できる。組換えベクターの導入方法としては、動物細胞 logy, 3, 133 (1990)}、リン酸カルシウム法(特間平2 H. Freeman and Company, NewYork (1992), Blo/Technolo 【0084】柏土田間としては、ヒトの細胞であるナマ ルバ (Namalwa) 無路、サルの無路であるCOS 笛覧、チャイニーズ・ハムスターの超階であるCHO値 間、HBT5637(特別昭63-299)等を挙げることが にDNAを導入する方法であればいずれも用いることが でき、例えば、エレクトロポレーション法(Cytotechno 【0085】毘虫畑抱を宿主として用いる場合には、例 パイギロジー・サプリメント1-38 (1 987-1997)、Bacul ovirus Expression Vectors. A Laboratory Hamual, W. gy. 6, 47 (1988)等に配載された方法によって、本発明 えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・ ci. USA. 84. 7413 (1987)) 等を挙げることができる。

【0086】即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびパ キュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上 :Bucill (ともにInvitorogen社製) 等を挙げることがで 済中に紐換えウイルスを仰た後、さらに組換えウイルス せることができる。敵方法において用いられる遺伝子尊 **入ペウターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pB1u か居虫価値に處死させ、本発明のポリペプチドを発現さ** のポリペプチドを知识することができる。

tera frugiperdaの卵巣細胞であるSF9、SF21(B 1, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、丁richoplusia nlの射巣細胞であるHigh5(Invitrog 【0087】パキュロウイルスとしては、例えば、夜盛 リフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス s)等を用いることができる。昆虫細胞としては、Spodop 戦科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カ (Autographa callfornica nuclear polyhedrosis viru aculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manua en社製)等を用いることができる。

【0088】組換えウイルスを翻製するための、昆虫細 ことができる。植物細胞を宿主細胞として用いる場合に は、発現ベクターとして、例えば、T1プラスミド、タ **問への上記組換え遺伝子導入ペクターと上記パキュロウ** イルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウ ム法 (特開平2-2270 75) 、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84,7413 (1987)] 等を挙げる ことしたがイクウイルスベクター権を推げることができ

モ、トマト、ニンジン、ダイズ、アプラナ、アルファル ファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等を挙げる 【0089】プロモーターとしては、植物細胞中で発現 できるものであればいずれのものを用いてもよく、例え ぱ、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35 S プロモーター、イネアクチン!プロモーター等を捧げ ることができる。宿主御覧としては、タバコ、ジャガイ

ア等を用いて行う。

【0090】組換えベクターの導入方法としては、植物 とができ、例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterlu パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(特許第26 細胞に DNAを導入する方法であればいずれも用いるこ a) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/0097 7)、エレクトロポワーション法 (特間困60-251887)

ことができる。

に、モレキュラー・クローニング第2版に配載されてい 【0091】遺伝子の発現方法としては、直接発現以外 5.方法等に体じて、分泌生産、配合ポリペプチド発現等 を行うことができる。酵母、動物細胞、昆虫細胞または 植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が 06856、特許第2517813)等を挙げることができる。 付加されたポリペプチドを得ることができる。

クターを保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中 【0092】本発明のDNAを組み込んだ組換え発現べ に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より 越ポリペプチドを採取することにより、 越ポリペプチド を製造することができる。 大闘歯等の原核生物あるいは 群母等の具核生物を宿主として得られた形質転換体を培 蒙する结地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素 魚、無假塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に 行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用い

[0093] 炭素原としては、酸生物が質化し得るもの ĶΠ いることができる。窒素源としては、アンモニア、塩化 リン数アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモ ン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カ ス、これらを含有する糖査、デンブンあるいはデンブン **甘水分解物等の技水穴物、酢酸、プロパメン酸等の有機** 数、エタノール、プロパノール等のアルコール製等を用 **運発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。** アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、 ニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプト であればよく、グルコース、フラクトース、スクロー ゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、

8 0~9. 0に保持する。pHの開整は、無機または有機 ン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシ ウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫 【0094】無機塩としては、リン酸却一カリウム、リ は、通常振躍培養または深部通気撹拌培養等の好気的条 件下で行う。培養温度は15~40℃がよく、培養時間 の数、アルカリ箔液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニ は、通常16時間~7日間である。培養中のpHは3. 酸鋼、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養

【0095】また、培養中必要に応じて、アンピシリン やテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよ プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた 組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときに は、必要に朽じたインデューサーを格勒に浴打してもよ で形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した徴 - β - D - チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、ULD 生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA) い。例えば、<u>lac</u>プロモーターを用いた組換えベクター 等を培地に添加してもよい。

を培養する培地としては、一般に使用されているRPM l Association, 1<u>99</u>, 519 (1967)]、 E a g l e のM E M培地 (Science, <u>122</u>, 501(1952)]、ダルペッコ改変 (Proceeding of the Society for the Biolog Ical Ne 【0096】動物細胞を宿主として得られた形質転換体 11640培地 (The Journal of the American Medica dicine, <u>73</u>. 1 (1950)) またはこれら培地に牛胎児血清 **等を茲加した培地等を用いることができる。培養は、通** MEM培地 (Virology. §, 396 (1959)]、199培地 pH6~8、30~40℃、5%CO2存在下等の条

【0097】昆虫細胞を指主として得られた形質転換体 を培養する培地としては、一般に使用されているTNN-FH 培地 (Pharmingen社製)、Sf-900 11 SFM培 也 (Life Technologies社製)、ExCel1400、

件下で1~7日間行う。また、培養中必要に応じて、カ

・レイツン、スコツコンゆの汽生を置か始あら浴をつけ

(16)

特開2001-352986

以, Grace's Insect Medium (Na ~5日間行う。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイ ture, 195, 788 (1962)) 等を用いることができる。培 集は、通常 b H 6 ~7、25~30℃等の条件下で、 ExCell405 いずれもJRN Blosciences社 シン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0098】植物細胞を宿主として得られた形質を挟体 は、細胞として、または植物の細胞や器質に分化させて 培養することができる。飲形質転換体を培養する培地と しては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スク 帯pH5~9、20~40℃の条件下で3~60日間行 う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグ ーグ(M S)焙粕、ポワイト(Wh11e)焙粕、またはこ れら始地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモ ンを添加した培地等を用いることができる。培養は、通 ロマイシン等の抗生物質を協助に添加してもよい。

oc. Natl. Acad. Sci. USA, 88. 8227 (1989), Genes D evelop., 4, 1288 (1990))、または特別平5-336963、W 094/23021等に配像の方法を準用することにより、較ポ せる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法が あり、使用する値虫質配や、生魔させるポリペプチドの **胞外膜上に生産される場合、ポールソンちの方法 U.B** は、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌さ る。本発明のポリペプチドが宿主粗粒内あるいは宿主細 iol. Chem., <u>264</u>, 17619 (1989)]、ロウちの方法 (Pr リペプチドを宿主細胞外に領極的に分泌させることがで 構造を変えることにより、胶方法を選択することができ 【0099】本発明のポリペプチドの生産方法として

本発明のポリペプチドの活性的位を含むポリペプチドの 分泌させることができる。また、特開平2-227075に配敵 されている方法に増じて、ジとドロ媒酸還元酵素遺伝子 手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させること 等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させる により、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に 【0100】すなわち、遺伝予組換えの手法を用いて、

体(トランスジェニック植物)を造成し、これらの個体 る。形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通 ペプチドを採取することにより、骸ポリペプチドを製造 【0101】さらに、遺伝子導入した動物または植物の 細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動 常の方法に従って、飼育または栽培し、乾ポリペプチド **物画体(トランスジェニック非ヒト動物)または植物画** を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリ を用いて本発明のポリペプチドを製造することもでき

製造する方法としては、例えば公知の方法(American J 【0102】動物個体を用いて本発明のポリペプチドを ournal of Clinical Nutrition, 63, 6395 (1996), Ame することができる。

8

can Journal of Clinical Nutrition, <u>63</u>, 6275 (199 、Bio/Technology, <u>9</u>, 830 (1991)) に特比て遺伝子 を導入して当成した動物中に本発明のポリペプチドを生 rican Journal of Clinical Nutrition.

る。鼓動物中の磐積場所としては、例えば、鼓動物のミ 【0103】動物価体の場合は、例えば、本発明のポリ ペプチドをコードする DNA を導入したトサンスジェー ック非ヒト動物を飼育し、酸ポリペプチドを鼓動物中に 生成・善値させ、数動物中より熱ポリペプチドを採取することにより、熱ポリペプチドを製造することができ る。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で が、例えば、乳腺細胞特別的なプロモーターであるαカ **ゼインプロモーター、Bカゼインプロモーター、Bラク** トグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロティンプロ 発現できるものであればいずれも用いることができる ルク (特別昭63-309192)、卵等を挙げることができ モーター事が好道に用いられる。

コードするDNAを導入したトランスジェニック結物を 公知の方法 (組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (199 5)、Trends In Blotechnology、<u>15</u>. 45 (1997))に準じて報路し、該ポリペプチドを越植物中に生成・蓄積さ 【0104】 植物価体を用いて本親明のポリペプチドを 製造する方法としては、例えば本籍明のポリペプチドを ゆる。核無細胞抽出液を遠心分離することにより得られ り、数ポリペプチドを生産する方法が挙げられる。 【0105】本掲明の形質転換体により製造されたポリ 分離により回収し、水系援衝液にけん関後、超音波破砕 一、ダイノミル等により超智を破砕し、無阻散抽出複巻 る上冷から、通常の酵素の単糖精製法、即ち、溶媒抽出 法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による法殿 ス、DIAIONHPA-15 (三数化成社製) 等レジ アロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた数 溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を造心 epharose FF (Pharmacia社製) 等のレジンを ペプチドは、例えば本発明のボリペプチドが、曲粒内に ンを用いた格イオン女似クロマトグラフィー社、SーS 用いた国イオン交換クロマトグラフィー社、ブチルセフ 在、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフ エーカンンが在、毎年点型気状型等の個気状型は等の中 **法を単独あるいは組み合わせて用い、情製博品を得るこ** せ、戯植物中より戯ポリペプチドを採取することによ 在、ジエチルアミノエチル (DEAE) ーセファロー 橋、ファンチプラス、マントンガクリンボモゲナイザ 水柱クロマトグラフィー社、分子配を用いたゲルる過

【0106】また、数ポリペプチドが細胞内に不溶体を **過心分類を行うことにより、代表圏分としたポリペンを** ドの不格体を回収する。回収したポリペプチドの不格体 **で成して発現した場合は、回数に曲幅を回収後数印し、** 

たは過折することにより、数ポリペプチドを正常な立体 構造に戻した後、上配と同様の単離精製法により酸ポリ

【0101】本発明のポリペプチドあるいはその勧格節 体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清 回収することができる。即ち、販格養物を上配と同様の に欧ポリペプチドあるいはその賠償付加体等の既導体を 遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分 を取得し、該可溶性面分から、上配と同様の単離精製法 を用いることにより、精製類品を得ることができる。 ペプチドの情製標品を得ることができる。

【0108】また、本発明のポリペプチドは、Fmoc 狂(フルオレニルメチルオキシカルボニル社)、tBo c 法 (t ープチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法 によっても製造することができる。また、Advanced Che al ech社, Perkin-Elmer社, Amersham Pharmacia Biote ch社、Protein Tec hnology instrument社、Synthecell -Vega社、PerSeptive社、島谷敷作所等のペプチド合成 個を利用して化学合成することもできる。

【0109】4.本発明のポリペプチドを配置する抗体

して用いることにより、ポリクローナル抗体、モノクロ ドの一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチドを抗原と 本発明のポリペプチドまたは骸ポリペプチドの部分断片 ボリムプチドの積製薬品、あるいは本発明のボリペプチ **ーナル抗体等、本発明のポリペプチドを起離する抗体を** 

[0110] (1) ポリクローナル抗体の作製 作製することができる。

本発明のポリペプチドの全長または骸ポリペプチドの的 として用い、適当なアジュバント(例えば、フロイント 分断ドボリペプチドの精製版品、あるいは本発明のポリ ペプチドの一部のアミノ駿配列を有するペプチドを抗原 の完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)また は水酸化アルミニウムゲル、百日咳ワクチン等)ととも に、動物の皮下、静脈内または腹腔内に投与することに よりポリクローナル抗体を作製することができる。

ができる。 放抗原の投与面は動物 1 匹当たり 5 0~1 0 0 r g が好ましい。 ペプチドを用いる場合は、ペプチド 【0111】投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3~ 20週令のシット、マウス、ハムスター等を用いること をスカシガイへモシアニン (keyhole limpet haemocyan In)や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合さ せたものを抗原とするのが留ましい。 抗原とするペプチ ドは、ペプチド台成構で合成することができる。

眼底静脈潰より採血し、眩血清が免疫に用いた抗原と反 【0112】 鮫抗郎の投与は、1回目の投与の後、1~ 2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に **応することを酵素免疫倒定法 (酵素免疫側定法 (ELI** SA供):医学自院刊(1976年)、Antibodies-A Labor atory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (198

8) 等で確認する。

8

をランパク質度性創で可溶化する。 岐可溶化液を特釈集

な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、鮫 強心分離、40~50%動和硫酸アンモニウムによる塩 【01.13】免疫に用いた抗原に対し、その血清が充分 血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を 等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合 析、カプリル酸式脱(Antibodies,A Laboratory manua プロテインA または G ーカラムあるいはゲル循過カラム 取得することができる。分離、精製する方法としては、 1. Cold Springlarbor Laboratory. (1988)]、または DEAE-セファロースカラム、降イオン交換カラム、

【0114】(2)モノクローナル抗体の作製 わせて処理する方法が挙げられる。 (a) 抗体産性細胞の腐製

ラットに抗原物質を最終投与した後3~7日目に、脾臓 チドに対し、その自律が十分な抗体値を示した サットを 的格に用いた本独田のようペプチドの昭分世下ポッペプ 抗体産生細胞の供給源として供する。酸抗体価を示した

を摘出する。

**哲腔し、ピンセットでほぐし、1・200rpmで5分** 【0115】 乾醇醛をMEM培地 (日水製薬社製) 中で 間違心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の **酔細胞をトリスー塩化アンモニウム援衝液(pH7.6** 5)で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培 地で3回洗浄し、得られた時細胞を抗体産生細胞として

骨値間細胞としては、マウスまたはラットから取得した 株化細胞を使用する。例えば、8ーアザグアニン耐住マ ミン (1. 5mmol/!)、2ーメルカプトエタノール (5×10³mol/!)、ジェンタマイシン (10 ウス(BALB/c由来)骨値随細胞株P3-X63A 88-U1(以下、P3-U1と略す) (Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978), Europ. J. Immun ol., 6, 511 (1976)), SP2/0-Ag14 (SPμ B / m 1) および牛胎児血清 (F C S) (CSL社製、1 0%)を加えた培地(以下、正常培地という)に、さら で格代するが、細胞酸合の3~4日前に正常培地で培養 9)], P3-X63-Ag8 (X63) (Nature, 256. 495 (1975)) 等を用いることができる。これらの細胞 2) (Nature, 276, 269 (1978)), P 3-X 6 3-A g 8 6 5 3 (6 5 3) U. Immunol., 123, 1548 (197 株は、8 —アザグアニン培地 [IPNI-1640培地にグルタ に8ーアザグアニン (15μg/ml)を加えた培地] し、融合には核細胞を2×107個以上用いる。 [0116] (4) 骨種間価間の関数

(6)で取得した抗体療生細胞と(6)で取得した中植腫細胞 **蒸留水 | リットル、p H 7. 2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞:骨軽腫細胞=5~10:1になるよ** をMEM焙地またはPBS (リン酸ニナトリウム1.8 38、リン酸一カリウム0.218、食塩7.658、 【0117】(c) ハイブリドーマの存数

う眠合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、

特開2001-352986

**田粒あたり、ポリエチレングリコールー1000 (PE** 0. 5~1m1 校打し、さらに1~2分間毎にMEM角 数細胞群に、攪拌しながら、37℃で、10゚抗体産生 G-1000) 2g. MEM 2ml およびジメチルス 【0118】待られた沈殿画分の笛酌群をよくほぐし、 ルホキシド (DMSO) 0. 7mlを混合した溶液を

也1~2m|を数回路加する。

【0119】 磁加後、MEM増地を加えて全価が50m 1になるように弱製する。核解製液を900rpmで5 分間遠心分離後、上清を拾てる。得られた沈殿画分の細 **哲を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込** み、吹出しでゆるやかに HA T 培地 [正常培地にヒポキ 0.4mol/1) およびアミノブチリン (4×10"m 【0120】 数懸濁液を96穴培養用プレートに100 サンチン (10\*mo1/1)、チミジン (1.5×1 ol/1)を加えた倍地]100ml中に懸調する。 9

manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 本発品のポリペプチドの部分形にポリペプチドに特異的 邸をとりアンチポディイズ(Antibodies, A Laboratory 37℃で7~14日間培養する。培養後、培養上海の-#1/穴ずひ分注し、5%CO1インキュベーター中、 (1988)) 等に済べられている野獣免疫巡覧法により、 に反応するハイブリドーマを選択する。

【0121】酵素免疫測定法の具体的関として、以下の 方法を挙げることができる。免疫の際、抗原に用いた本 レートにコートし、ハイプリドーマ培養上滑もしくは後述の(d)で得られる精製店体を第一店体として反応さ 質あるいは放射線化合物等で保護した抗ラットまたは抗 マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標動物質 に応じた反応を行ない、 本発明のポリペプチドに特異的 発用のポリペプチドの部分断下ポリペプチドを適当なブ せ、さらに第二だ体としてピオチン、群繁、化学発光物 に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産す るハイブリドーマとして選択する。

8

目は、正常培地を使用する)、安定して強い抗体価の配められたものを本発明のモノクローナル抗体を産生する 【0122】 粒ハイブリドーマを用いて、阻界格釈法に よりクローニングを2回繰り返し(1回目は、HT培地 (HAT培地からアミノブテリンを除いた培地)、2回 ハイブリドーマ株として選択する。

マクスに、(c)で取得した本発明のボリベブチドに対 プリスタン処理 (2、6、10、14ーテトラメチルペ ンタデカン (Pristane) 0. 5 m | を取腔均投与し、2 週間飼育する)した8~10週令のマウスまたはヌード するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞5~2 0×10<sup>4</sup>細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日 (d) モノクローナル抗体の弱製

間でハイブリドーマは腹水癌化する。

【0123】乾額水格化したマウスから関水を採取し、3、000rpmで5が配込で発して固形分を除去する。切られた上海より、ボリクローナルで用いた方柱とのはつけてモノクローナル信体を構製、即はつちにそうができる。抗なのサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。タンパク質問は、ローリー注表るいは280mmでの販光度より算出

【0124】5、本発明のポリペプチドを生産する組換

スウイルスペクターの関製法 以下に、本類明のボリペプタドを特定のトト組織内で生 以下に、本類明のボリペプタドを特定のトト組織内で出 値するため単純えセイルスペクターの観製法について 述べる。本類明のDNAの完全度。DNAをとに、必 取に応じて、続ポリペプタドをコードする部分を合む 当た表さのDNA所を閲製する。

に適合したパッケージング価格に導入する。 ペッケージ ゲドをコードする DNA の少なくとも I つを欠損してい 1. 3 等を用いることができる。 パッケージング細胞で補 env体のようんプサドが、フンキセイラスヘケケーの vpr. vpu. vif. tat. rev. nef40 【0126】核組換えウイルスベクターを、鼓ベクター ソグロ智なケイブスのスッケジーングに必要なポリムゲ る題数スケイラススクターの数欠値からポコスプチドか 植稿できる細胞は全て用いることができ、例えばヒト臂 採由来のHEK293相称、マウス機能が細胞NIH3 **恐かる ポンヘンチ ドパつしな、 フトロケノ ラメベケター** の場合はマウスレトロウイルス由来の888、pol、 場合はHIVウイルス由来の8ag、pol、env、 ポコペプチド、アゲノケイガスペクターの場合はアナノ ウイルス由来のEIA、EIB等のポリペプチドが、ア デノ間伴ウイルスの場合はRep (p5、p19、p4 0)、 V p (Cap) なのおひんどやドが、カンダイケ イルスの場合はNP、P/C、L、M、F、HN等のボ リペプチドが挙げられる。

【0127】 ウイルスペクターとしては上記パッケージ 50 8

ング細胞において粗換えウイルスが生産でき、緑的細胞 で本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含 有しているものが用いられる。 プラスミドベクターとし (19 95)) , pBabePuro (Nucleic Acids Res., 18, 3587 【0128】プロモーターとしては、ヒト組織中で発現 ぱ、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) の1E (1me dlateearly) 遺伝子のプロモーター、S V 4 0 の初期プ ロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチュネインプロモーター、ヒートショックタンパク質プロ C14NFG (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 -3596 (1990)) , LL-CG, CL-CG, CS-CG, CLG (Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)] , pAdex1 (Nucleic る。また、ヒトCMVの15遺伝子のエンハンサーをブ Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)] 等が用いられる。 できるものであればいずれも用いることができ、例え モーター、SRaプロモーター棒を挙げることができ ロモーターと共に用いてもよい。

【0 1 2 9】パッケージング細胞への組換えウイルスペクターの導入法としては、例えば、リン膝カルシウム猛(特開平2-227075号公盤)、リボフェクション法(Pro-Natt)・Acad、Sci. U SA, 84, 7413 (1987))等を挙

6. 本発明のDNA、ポリペプチドまたは抗体の利用 (1) 本発明のDNAの発現を検出する方法

(1)本程明のDNAの発現を検出する方在 本発明のDNAを用いて、検体における本発明のDNA の마RNA発現画、乾mRNAの構造変化を検出することができる。 【0130】検体としては、本発明のDNAの発現変化が原因となっている疾患を打する患者ならびに酸常者より配得した組織、血清、暖滞物の生体試料、膨生体試料、から配移して試験習行の適当な体は対から取得した組織を、パラインあるいはクリネスタット切片として単層したもの等かも取得したmRNAあるいは全RNA等が用いられる(以後、乾mRNAおよび全RNA等数体相来RNAとおする)。

(0 | 3 | 1) 検出する方法としては、例えば (1) ノーゲンプロット法 (2) in situハイブリダイセイション 法、 (3) だ重的り C R 法、 (4) デファレンシャル・ハイブリダイゼイション法 (Trends in Genetics <u>7</u> 31 4, (1991) 、 (5) D N チップ法 (Genore Researc 社等の方法等が挙げられる。以下、名検出法について詳さます。

【0132】①ノーザンプロット注 機体用来RNAを少り環境動で分構後、ナイロンフィルシー等の支持体に転すする。 転写像、本発明のDNA より翻製した整御プローブを用いて、ハイブリダイゼイ プヨブならびに発酵グローブを用いて、ハイブリダイゼイ プヨブならびに発酵が行った。 体等像、 級プローブは関的に結合したRNAのパンドを検出する。 健構者と題句

由来の検体RNAについて核検出結果を比較することにより、核RNAの発掘量ならびに構造の変化を検出することができる。ハイブリダイゼインョンを行う際には、これでコンとも対象はは、Nイブリダイゼインョンを たないイブリッドを形成する条件でインキュペーションする。 偽理性を防ぐためには、ハイブリダイゼイションならびに然声工程をモレキュラー・クローニング第2版に配戴の方法に借して高ストリンジェントな条件で行うことが選ましい。

(0133) ノーザンブロット技に用いる環盤プローブは、例えば、公知の方法(ニッケ・トランズレーション・アンダム・ブンダム・プライミングを込ますーナッング)により放射性団位体、セオテン、蛍光路、化学技光路等を、本発明のDNAあるでは終DNAの配列が50段化でよりゴタクレオチドに取り込ませることで開製できる。標盤プローブのmRNAの結合直は数mRNAの発現監をではで変更ができている。また、機能プローブが結合するフィルター上の部位を分析することで、数mRNAの構造変化を知ることが

【0134】②In situハイブリダイゼイション法生体から取得した組織をパラフィンあるいはクリオスタット別片として組織して得られた検体、および⑥記鑑の掲載プロープを用いてパイブリダイゼイションならびに洗浄の工程を行う。洗浄後、①と同様の方法により数プロープと特別的は拾合したmRNAの発現置を検出することができる。In situハイブリダイゼインョンならびに添予工程をカレント・プロトロールズ・イン・モレキュラー・パイオロジー等に配されている方法に単してあストリンジェントな条件で行うことが留ましい。

様体由来RNA、オリゴdTプライマーまたはランダムプライマー、および逆転写酵素を用い、cDNAを台成することに基づいた方柱を用いることにより目的とするKNAを検出することができる(以後、焼cDN を検 体由来。DNAと終する)。検体由来RNAがMNAの場合は、上配ののいずれのプライマーも用いることができるが、終性は無KNAが全るが、参模体は来RNAが全るが、参模体は来RNAが全をあり、オリゴdTプライマーを用いることが必要である。

[0135] @定面的PCR法

「「0136」定量的PCR性では、後体由来CDNAを テンプレートとし本発明のDNAが有する描述配列に第 つき設計したプライマーを用いてPCRを行うことで、 特定のmRNA由来のDNA断片が増縮される。 説物価 DNA断片の直は截mRNAの発現直を反映することか こ アクチンやC3PDH (gyocraldehyd 3-phosphat e dehydrogenase) 移るコードするDNAを内部コンドリールとして置くことで数mRNAの面を定面することが可能である。また、該増幅DNA断片をグル配気成動に可能である。また、該増幅DNA断片をグル配気成動に

より分離することで、窓mRNAの構造の変化を知ることもできる。本様出法では、植的配列を特質的にかつ効率的に指揮する選出なプライマーを用いることが設まして、通当なプライマーは、プライマー間の結合やプライマー内の結合を起こさず、アニーリンが通段で構的ことが大き、特別も、有いの外に指してい、変性条件で構的。DNAが はずれる等の条件に指して、変性条件で構的。DNAが はずれる等の条件に指して、変性条件で構的。DNAが はずれる等の条件に行うことができる。特別 DNA所付の定置は増価条約が散数関数的に増加している PCR反応の内に行うことが必要である。 は PCR反応の内に行うことが必要である。 は PCR反応の内に行うことが必要である。 は PCR反応の内に行うことが必要である。 は PCR反応の口に分か複数である。このような 中でR反応してがか複数を記してある。

とかできる。 【0131】④チファレンシャル・ハイブリダイゼイション在およびDNAキップ紙

あるいはスライドガラスやシリコン等の基盤に対してハ イブリダイゼイションならびに洗剤を行う。洗剤後、本 フィルターあるいは基盤上にアクチンやG3PDH等の ②に配載された方法で顕製した技体由来 c D N A をプロ 発明のDNAと特異的に結合した。DNA量を測定する ことにより鮫cDNA由来のmRNAの発現量の変動を 被出することができる。 デンァフンツャル・ハイブリダ イゼイション法 およびDNAチップ法のいずれの方法も 内部コントロールを固定化することで、対照検体と切的 検体の間での核mRNAの発現の違いを正確に検出する ことができる。 また対照機体と傷的機体由来のRNAを もとにそれぞれ異なる慷慨 d N T P を用いて標識 c D N A 合成を行い、 1 枚のフィルターあるいは 1 枚の基盤に せることで正確な鮫mRNAの発現量の定量を行うこと 一ブとして、本発明のDNAを固定化させたフィルター IJ の数数c DNA プローブを回写 にくイブリダイズお

【0138】⑤RNase保護アッセイ法 本発明のDNAの3、梅にT7プロモーター、SP6プ ロモーター等のプロモーター配別を結合し、RNAポリ メラーゼを用いたinvitroの転写来により確認した rN アを用いて、確認したアンチセンスRNAを信成する。 Bを確認アンチセンスRNAを、検体由来RNAとは 含。 KR細アンチセンスRNAを、検体由来RNAとは 後、RNaseで前化し、消化から保護された 指を分ル環気動によりパンドを形成させ検出する。 得 られたパンドを店置することで、上配填離アンチセンス RNAと結合するmRNAの発現置を定置することがで 【0139】尚、①一ののいずれかに配戴した方在に用いられるDNAとしては、例えば配列番号6~10のいずれかで表される協塞配列を有するDNAもしくはそれらから得られるDNA特に多る検出に供する検性に供する検性としては、アレルギー、アドビー、場長、活形を関係をしては、アレルギー、アドビー、場長、花粉底、製造造験、自己免疫疾患、核輸出有当主発展等の資準な免疫性関係の活性化を付き疾患。

**原内、糸球体野炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、ララ血** 性心不全、外傷性脳損傷、炎症性関疫困等の感染や炎症 を伴う疾患、パーキットリンパ腫、ホジキン病、各種リ ン、特別、成人工組造自由が、現在関係等の異常な組織地 殖を伴う状態、関節リウマチ、変形性関節政等の異常な 禁粒芽価胞や滑膜組織の活性化を伴う専用、エイズ等の へ択臼、アランスイヤー氏、パーキソンン伝体の存品値 ウイルス性疾患、適血性脳疾用の神経細胞の障害に基づ 哲の音句に対しく状態、見緊吸化・耳状を中の中省結構 間の質用な分化問別を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎 健反応候呀(SIRS:systemic inflammatory resp onse syndrome)、成人學吸動迫症候群(ARDS:adu **エンドトサンソショック、改由値、値出物局段、値在B** 型肝炎、慢性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性額 れ、当時検出方法により本発明のDNAの発現を検出す 【0140】(2) 本発明のDNAの疫間を検出する方 Itrespiratory distress syndrome)等の疾患が挙げら ることで、上記俠用の砂断に利用することができる。

以下、散終者における本発明のDNAの変異の有無を検 田する方法について述べる。被験者における数DNAの 度異は本発明のDNAと下配方法により直接比較するこ とにより検出することができる。被験者から、組織、値 消、唾液等のヒト生体試料あるいは、較生体試料から樹 立した初代培養問題由来の試料を集め、核生体試料ある いは核初代培養問題由来試料中からDNAを抽出する 胶試料由来のmRNAより常法によりcDNAを取 る)。 飲食体由来DNAまたは c DNAを貸型とし、本 発明の DNAが存する協意配列に基づを設計したプライ マーを用いて P C R 法等により D N A を増幅する。得ら (以下、鼓DNAを模体由来DNAと称する)。また 伊ずる(以下、数c DNAを機体由来c DNAと称す れた物価DNAを試料DNAとして用いる。

[Trends Genet., 7, 5 (1991)] 、〇一本協コンフォメ る方法として、野生型対立遺伝子を有するDNA値と変 【OI41】I的協DNAに底質があるかどうかを検出す 質対立遺伝子を打する DNA 鎖とのハイブリダイズによ り形成されるヘテロ二本観を検出する方法を用いること 3)〕、⑤ミスマッチの化学的切断法 (CCM, chemical cl 的切断法 (Nature Genetics, 9, 103-104 (1996))、⑤ かできる。ヘテロニ本観を検出する方法には、①ボリア (1996). Tom Strachan and Andre w P. Rend (BIOS Sci entific Publishers Li mited)]、④ミスマッチの酵素 定性ゲル電気込動法(Mutat. Res., <u>288</u>, 103-112 (199 (Genomics, 20, 1-4 (1994)) 等の方法 クリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法 eavage of mismatches) (Human Notecular Genetics 3)] ⑥タンパク質短短試験 (protein truncation tes —ション多型解析法 (Genomics, 1<u>6</u>, 325-332 (199 が挙げられる。以下、上配方法について説明する。

## 【0142】 ①ポリアクリルアミドゲル電気泳動による

版DNAを配列番号6~10のいずれかに配載の の間幅DNA断片による2本観形成処理を推注により行 塩基配列に基力を設計したプライマーにより、2006 pよりも小さいDNA断片として増幅する。本発明のD は、魔異を持たないホモ二本鎖よりも移動度が遅く、そ N A および被験者由来の核増幅D N A 断片を用い、各々 れらはホモ二本伽とは別のパンドとして検出することが できる。特製のゲル(Hydro-llnk,NDEなど)を用いた方 が分離度はよい。200bpよりも小さい断片の検索な らば、挿入、欠失、ほとんどの1塩基圏換を検出可能で 検体由来DNA あるいは検体由来 c DNAをテンプレー う。処理後、ポリアクリルアミドゲル電気決動を行う。 ある。ヘテロニ本鎖解析は、次に述べる一本鎖コンフォ メーション多型解析と組み合わせた1枚のゲルで行うこ 核DNAの底段によりヘテロ二本側が形成された場合 とが留ましい。

[0143] ②一本銭コンフォメーション多型解析法

一本録コンフォメーション多型解析(SSCP解析:st では、機体由来DNAあるいは機体由来CDNAをテン プレートに、配列番号6~10のいずれかに記載の塩基 配列に基づき設計したプライマーにより、200bpよ りも小さい断片として増幅した駁DNAを変性後、未変 性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動する。 DNA畑 幅を行う際にプライマーを放射性同位体あるいは蛍光色 素で慎酷し、乾標礎を指揮とするか、または未類戯の増 幅産物を電気泳動後、銀染色することにより、増幅した 胶DNAをパンドとして検出することができる。本発明 のDNA由来の指向のNA断片と、被戦者由来のものとを同時 に電気決動することにより、変異を持った断片を移動度 ngle strand conformation polymorphism analys is) の違いから核出できる。

[0144] ③ミスマッチの化学的切断法

ミスマッチの化学的切断法(CCM法)では、検体由来 DNAあるいは検体由来cDNAをテンプレートに、核 DNAを配列番号6~10のいずれかに記載の塩基配列 CCM法は最も感覚の高い彼出法の一つであり、キロ人 本発明のDNAに放射性同位体あるいは蛍光色素をとり 込ませた傾瞰DNAとハイブリダイズさせ、四酸化オス ミウムで処理することでミスマッチしている場所のDN に基づき設計したプライマーで増編したDNA断片を、 Aの一方の観を切断させ変異を検出することができる。 一スの長さの検体にも適応できる。

上記四段化オスミウムの代わりにT4ファージリゾルベ - スとエンドヌクレアーゼV 1 I のような細胞内でミス [0145] ④ミスマッチの酵素的切断法

マッチの修復に関与する酵類とRNaseAと組み合わ

せることで、酵素的にミスマッチを切断することもでき

マーで増幅したDNA断片を化学的変性剤の濃度勾配や 合とない場合では増幅したDNAのゲル内での移動度が 変性ゲル電気泳動法 (denaturing gradient gel electr 0のいずれかに配載の塩基配列に基づき設計したプライ 個度勾配を有するゲルを用いて電気泳動する。増幅した し、変性後は移動しなくなる。眩DNAに変異がある場 異なることから、変異の存在を検出することが可能であ 5. 検出感度を上げるにはそれぞれのプライマーにポリ は検体由来c DNAをテンプレートに、配列番号6~1 ophoresis:DGGE法)では、検体由来DNAおるい DNA断片はゲル内を一本鎖に変性する位置まで移動 (G:C) 塩末を付けるとよい。

【0146】⑥ タンパク質短縮試験 (protein trunca tion te st:PTT法)

フト突然変異、スプライス部位突然変異、ナンセンス突 有するDNAの5、末端にT1プロモーター配列と真核 数数数によりポリペプチドの欠損を生み出すファームシ は、配列番号6~10のいずれかに喪された塩基配列を し、眩プライマーを用いて検体由来RNAより逆転写P CR (RT—PCR) 法でc DNAを作成する。 骸c D N A を用い、 In vitro転写、朝駅を行うと、ポリペプチ ドが生産される。眩ボリペプチドをゲルに決動して、眩 ペプチドに欠損がある場合は、完全長ポリペプチドより ポリペプチドの味動位置が完全長ポリペプチドに相当す る位置にあれば欠損を生み出す変異は存在せず、骸ポリ 短い位置に該ポリペプチドは決動され、 核位置より欠損 **然変異を特異的に検出することができる。PTT法で** 生物翻駅開始配列をつないだ特殊なプライマーを設計 の程度を知ることができる。

本発明のDNAが有する協議配列に基づいて設計したプ ライマーを用い、常法により変異を有する機体由来DN り、検体由来DNAあるいは検体由来CDNAが特定の Aならびに検体由来 c D N A の塩基配列を決定すること が可能である。決定された塩基配列を解析することによ 疾患を有する被験者の場合には、該疾患の原因となる変 【0147】上配の方法で変異が検出された場合には、 異を特定できる。以後、眩変異を検出することにより、 疾患の診断に利用することが出来る。

【0148】上配方法により検出されるDNAのコード 近、数DNA中のイントロンおよび関節配列のような非 コード領域を検査することによって検出し得る。非コー ド領域中の変異に起因する疾患は、上記に配載した方法 に従い対照検体と比較した場合の、疾患患者における異 領域における密異以外の変異の検出には、核DNAの付 帯なサイズの、または異常な生産価のm R N A を検出す ることで確認することができる。

I Oのいずれかに配戴の塩基配列を育するDNAをハイ 【0149】このようにして非コード領域における変異 の存在が示唆された該DNAについては、配列番号6~

る変異は上述のいずれかの方法に準じて探索することが り、クローン化することができる。非コード領域におけ ブリダイゼイションのブローブとして用いることによ

**時間2001-352986** 

(22)

Genetics Linkage. The John Hop kins University Pre ことができる。上配変異を検出する方法で診断可能な被 ル・ヌクレオチド・ポリモルフィズム) として回先する 気道過敏、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患等の異常な トリンパ値、ホジキン府、各種リンパ値、成人工価額白 【0150】見い出された変異は、Handbook of Human 血膚、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、関節リ ウマチ、変形性関節炎等の異常な媒維芽細胞や漫画組織 の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス性疾患、戯血 **供脳疾患の神秘細胞の障害に基力へ疾患、アルツにイヤ** 思、動脈硬化・再狭物などの平沸節細胞の異常な分化物 ss. Baltimore (1994) に配載された方法に従い統計処 理を行うことで、疾患との連鎖があるSNPs(シング 強を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症候群(S ク、敗血症、微生物感染、便性B型肝炎、慢性C型肝炎、 インスリン位存性・非位存性糖尿病、糸球体腎炎、乾 数数としては、アフルギー、アトパー、軸部、右部鎮 免疫細胞の活性化を伴う疾患、エンドトキシンショッ 一位、パーキンンン伝導の神経細胞の腫動に魅力へ依 IRS : systemic inflammatory response syndrom

e)、成人呼吸的迫症候群(ARDS:adult respirato ry distress syndrome)等のいずれかの変担を有する包 【0151】 (3) 本発明のDNA またはオリゴヌクレ を挙げることができる。

オチドを用いて本発明のポリペプチドをコードするDN アンチセンスRNA/DNA技術 いいイオサイエンスと 1). Biotechnology, 9, 358 (1992), Trends in Biotec インダストリー、50.322 (1992)、化学、46、681 (199 プル・ヘリックス技術 (Trends in Blotechnology, 🔟. 本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写または inology, 10, 87 (1992) . Trends in Biotechnology. 10. 152 (1992)、相間工学、16. 1463 (1997))、トリ 132 (1992)) 等により、本発明のDNAを利用して、 Aの転写または翻訳を抑制する方法

またはオリゴヌクレオチドを、本発明のポリペプチドを 【0152】 駁即制方法は、アレルギー、アトピー、軸 世春の異常な免疫相間の活性化を伴う疾患、エンドトキ 発現でさる系 (生体を含む) に共存させ、設ポリペプチ ドの発現を転写、開訳アベラで抑制できる。

朝散を抑制することができる。例えば、本発明のDNA

E. 花粉虚、気道過敏、自己免疫疾患、移植片对宿主疾 シンショック、敗血症、衛生物感染、慢性B型肝炎、便 性C型肝炎、インスリン依存性・非依存性関原病、糸球 体質炎、乾癬、体腫、各種脳脊髄炎、ウラ血性心不全、

以群(SIRS:systemic in flammatory response sy **釈題、陶酌リウマチ、既形性陶酌改等の異常な類権学組 粒や滑弾組織の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス** 成人工細胞白血病、現性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う ドをコードするDNAの底図が原因となっている疾患の アラシスイトー伝、スーキソンソ氏中の苔紅質配合製物 に魅力へ疾患、動脈硬化・再味やゆの甲油筋細胞の異常 な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症 ndrome)、成人呼吸和迫症候群(ARDS:adult resp 柱状態、戯血性脳疾患の神経細胞の障害に魅力へ疾患、 Iratory distress syndrome) 等、本路馬のポリペプチ 外傷性脳損傷、故症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾 邸、パーキットリンパ間、ホジキン仮、名信リンパ間、 治療または予防に利用することができる。

【0153】(4)本発明のDNAまたはオリゴヌクレ オチドを用いて本発明のポリペプチドをコードするDN Aのプロモーター領域および転写制御頭域を取得する方

して用い、公知の方法(モレキュラー・クローニング算 のポリペプチドをコードする DNAのプロモーター領域 は、以下の方法で、ラットあるいはヒト由来のものを取 本発明の DNA またはオリゴヌクレオチドをプロープと および低等制御領域を取得することが可能である。例え 2 版、点点大学因科学即名所制造用究的值,所描配工学 以製プロトコール,券間社 (1993年) ) により、本発明 何することができる。

て、プラークハイブリダイゼーション等の方法でスクリ 【0154】ラットあるいはヒトの細胞や組織から単糖 **ラリーに対して、本発明のDNAまたはオリゴヌクレオ** た、ほられたゲノム DNAの塩基配列と c DNAの塩基 ーニングする。 胶スクリーニングにより、ハイブリダイ した染色体DNAを用いて作製したゲノムDNAライブ ズするゲノム DNAを取得する。 核DNAよりプロモー 配列を比較することによりエキソン/イントロン構造を チド (特にc DNAの5・関の部分) をプローブとし ター領域および転写制御領域を得ることができる。ま 明らかにすることができる。

即即回収を収得することができる。プロモーター包装と しては、昭乳動物価間において本発明のボリペプチドを 【0155】尚、同様の方法を用いて、他の非ヒトほ乳 動物においても数DNAのプロモーター領域およが転写 れ、転写制御領域としては、本発明のポリペプチドをコ ードする DNAの基本転写を指摘するエンパンサー配列 および成指するサインンサー配列等をむむ領域が挙げら れる。例えば、ヒトの母性で、本籍明のボリベブチドを コードするDNAの配写に関与するプロモーター領域お よび転等制御領域を挙げることができる。得られたプロ モーターおよび転び制御領域は復述のスクリーニング方 コードするDNAの基本転写に関与する領域が挙げら

捕を解析するために有用である。

DNAを用いたスクリーニングにより、該DNAの転写 [0156] (5) 本発明のポリペプチドをコードする を制御する医薬を取得する方法

物質をスクリーニングすることができる。核DNAのm **患者由来の細胞株に種々の被験化合物を添加し、本発明** のDNAを用いて、mRNAの発現の増減を検定するこ とで数DNAの転写もしくは翻訳を抑制または促過する RNAの発現の間域は、上配したPCR法、ノーザンプ ロット法、RNBS6保護アッセイ法により検出でき 【0157】 燈巻由来細胞株に種々の被験化合物を添加 し、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用 いて、散ポリペプチドの発現の増減を検定することで骸 DNAの転写もしくは翻訳を促造する物質をスクリーニ は、上配した蛍光抗体法、酵素免疫測定法(ELISA ングすることができる。核ポリペプチドの発現の増減

法)、放射性物質傷觀免疫抗体法(RIA)、免疫組織 染色法、免疫細胞染色法等の免疫組織化学染色法(AB C住、CSA法等)、ウェスタンプロッティング法、ド ットブロッティングは、免疫は降法、サンドイッチEL ISA 法により検出できる。

【0158】また、本発明のポリペプチドをコードする クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CA として連結したレポータープラスミドを構築し、適当な 細胞宿主に導入して形質転換体を得た後、その形質転換 体に種々の被験物質を添加し、レポーター遺伝子の発現 コードするDNAの発現を転与レベルで制御する困欺を の地域を解析することにより、本発明のポリペプチドを 1) 遺伝子やルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子 DNAのプロモータ領域および転写制御領域の下流に、 スクリーニングすることができる。

【0159】(6) 本発明のポリペプチドを用いたスク リーニング方法により本発明のポリペプチドに作用する 医薬を取得する方法。

る医薬をスクリーニングすることができる。また、精製 本発明のボリペプチドあるいは数ボリペプチドの部分へ プチドを発現した形質転換体と種々の被験物質とを共存 させ、販形質転換体におけるNF一kBの活性化の変動 チドも眩ボリペプチドに特異的に作用する医薬のスクリ を解析することにより、本発明のポリペプチドに作用す した数ポリペプチドあるいは数ポリペプチドの部分ペプ ーニングに利用することができる。 該スクリーニングに チドが関与した疾患の治療のための医薬として有用であ よってはられた物質は、本発型のDNA およびポリペプ

【0160】以下、2種のスクリーニング法について脱

本発用のポリペプチドあるでは数ポリペプチドの部分へ

法に利用することができる他、 数DNAの転写の制御協

スクリーにンが符(こ)

いはポリペプチドの、散探索用形質転換体に対する結合 と被験物質とを水性媒体中で共存させる。共存後、上配 る。形質転換していない宿主の微生物、動物細胞、また は昆虫細胞を対照群として比較し、骸形質転換体におけ るNFーxBの活性化の程度を変動させる被験物質を選 た、眩探採用形質転換体に特異的に結合する化合物ある 間、または昆虫細胞 (以後探索用形質転換体と称する) プチドを生産するように形質転換した微生物、動物細 2. に配載の方法に準じてNFー×Bの活性を測定す 択することで目的の物質を取得することができる。ま を阻害することを指標にして、上配と同様の方法によ り、镙的化合物を競合スクリーニングすることができ 【0161】 精製した本発明のポリペプチドまたは核ポ リペプチドの一部を構成するポリペプチドは、骸ポリペ プチドに特異的に結合する概的化合物を選択するのに用 いることができる。梛的化合物を定置するには、本発明 プチドあるいは骸ポリペプチドのボリペプチドに結合す のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて上配の 免疫学的方法により行うことができる。 また、 核ポリペ る標的化合物の結合を阻害することを指標に、標的化合 物を競台スクリーニングすることができる。 【0162】スクリーニング法(2)

スチックピンまたはある種の固体支持体上で高密度に合 り、本発明のポリペプチドにより転写制御を受ける遺伝 成し、駭ペプチドに選択的に結合する化合物あるいはポ リペプチドを効率的にスクリーニングすることができる (WD84/03564)。 尚、本発明のポリペプチドを発現する 形質転換体を用いて、遺伝子の発現を解析することによ 数ポリんプチドの一部が構成するんプチドが多数、 子をスクリーニングすることができる。

【0163】(7) 本発明のDNA、または核DNAと 本発明のDNA、または核DNAと相同な配列からなる RNAを含有するウイルスペクターを用いた遺伝子治療 よび遺伝子治療剤に用いる基剤を翻合することにより製 水、塩化ナトリウムまたは塩化ナトリウムと無機塩との ()]。 遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤 **混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキス** トラン、グルコース等の観浴後、グリシン、アルギニン 等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とゲルコース ズ油等の植物油又はフシチンもしへは非イギン腎由活性 # を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤と 剤は、上記の5.で作製した組換えウイルスペクターお 容液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、こ れらの基剤に資透圧調整剤、pH悶盤剤、ゴマ油、ダイ に用いる基剤であればどのようなものでもよく、蒸留 **散液として注射剤を開製してもよい。これらの注射剤** 相同な配列からなるRNAを含有する遺伝子治療剤 告することができる (Nat ure Genet., <u>8</u>. 42 (199 **旬等の界面活性刻等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、** 

処理をした上記の基剤に遺伝子治療の直前に溶解して治 僚に使用することができる。本発明の遺伝子治療剤の投 **資体の場合はそのままで、個体の場合は必要により減額** して開製することもできる。本発明の遺伝子治療剤は、 与方法としては、患者の治療部位に吸収されるように、 局所的に投与する方法をあげることができる。

時間2001-352986

(54)

ウイルス・ヘキソン・タンパク質に特異的なポリリジン 作製し、得られたコンプレックスをアデノウイルスベクターに拍合させることにより、ウイルスベクターを翻製 するハンができる。 数ケイテスパクターは安定に蘇む笛 細胞内で分解され効率的にDNAを発現させることがで - コンジュゲート抗体と組み合わせてコンプレックスを 胞に到達し、エンドソームにより細胞内に取り込まれ、 【0164】過当なサイズの本発明のDNAを、

【0165】(一) 鎖RNAウイルスであるセンダイウ イルスをベースにしたウイルスペクターも開発されてお り (特願平9-517213、特願平9-517214) 、遺伝子治療を 目的としてKRGF-1 遺伝子を組み込んだセンダイウ 非ウイルス遺伝子移入法によっても病巣に輸送すること イルスペクターを作製することができる。鮫DNAは、

には、リン酸カルシウム共优法(Virology、<u>52</u>, 456-46 7 (1973); Science, <u>209</u>, 1414-1422 (1980))、マイク 1<u>7</u>, 7380-7384 (1980) : Ce11, <u>27</u>, 223-231 (1981) : N ature, <u>294</u>, 92-94 (1981)) 、リポソームを介した課題 合-介在移入徒 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>84</u>, 74 【0166】当該分野で公知の非ウイルス遺伝子移入法 1288 (1990); Circulation, <u>83</u>, 2007-2011 (1992)) あるいは直接DNA取り込みおよび受容体-媒介DNA移 入法 (Science, 247, 1465-1468 (1990); J. Blol. Che Gene T her., 3,267-275 (1992) ; Science, 249, 1285-88. 4255-4259 88, 8850-88 ロインジェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, m., 266, 14338-14342 (1991) ; Proc. Natl. Acad. Sc 1. USA, 87. 3655-3659 (1991); J. Biol. Chem., 26 54 (1991) ; Hum . Gene Ther., 3, 147-154(1991)) 再 77. 5399-5403 1980) : Proc. Natl. Acad. Scl. USA. 4.16985-16987 (1989) : BioTechniques, 11, 474-485 (1991) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410-3414 13-7417 (1987); Biochemistry, 28, 9508-9514 (198 9); J. Biol. Chem., 264. 12126-12129 (1989); Hum. 7 (1990) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1991) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1990) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, を挙げることができる。

【0167】リポソームを介した関聯合一介在移入法で とにより、当該組織の局所的な遺伝子の取り込みおよび 発現が可能であることが腫瘍に関する研究において報告 はリポソーム詞製物を切的とする組織に直接投与するこ されている (Hum. Cone Ther., 3, 399-410 (1992))。 特開2001-352986

チドまたは数ポリペプチドを含む組織を免疫学的に検出 【0168】(8)本発明の抗体を用いて本発明のポリ 抗原抗体反応を行わせることにより、本発明のポリペン 一、唯思、花粉盘、気温透散、自己免疫疾患、移植片对 体風、各種脳脊組炎、うっ血性心不全、炎症性固度阻等 の感味や故症を伴う疾患、パーキットリンパ腫、ホジキ ン伝、各種リンパ腫、成人工価値白白伝、現在関係等の 84. はな細胞増殖を伴う疾患、慢性関節リウマチ、肺線維 用、エイズ等のウイルス性疾用、虚血性脳疾患の神経細 か等の平滑筋値間の異常な分化地強を伴う疾患、多疑器 市主疫用等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エン 智の智能に起力へ依旧、アルツハイヤー伝、パーキソン ン会争の存益質的質値に超力へ鉄曲、動脈順行・再映 不会、会身性说值反応应假群(SIRS:systemic inf ゆ、本知母のポリペプチドをコードするDNAの仮因が **供た、数核出方法は、ポリペプチドの定価にも用いられ** 本野明のポリペプチドを特異的に認識する抗体を用い、 ドトサツンショック、吸血症、旋生物感味、便性問題肝 以、慢性C型肝炎、インスリン放存性・非效存性糖尿 点、糸球体腎炎、外傷性固須傷、変形性関節炎、乾虧、 lammatory response syndrome)、成人呼吸再迫应做群 原因となっている疾患の診断に利用することができる。 することができる。敬後出法は、アフルボー、アトピ 位等の異常な様は芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾 (ARDS : ndult respiratory distress syndrome) スプチドを免疫学的に検出する方法

【0169】免疫学的に利出および定面する方法としては、世光的体法、砂索免疫領定性(ELISA柱)、粉針性物質曝免疫消体性(RIA)、免疫組織契急法や免疫組織に学染色法(ABC法、CA基等)、ウェスシンプロッティンが法、ドットプロッティンが法、Rの底位には、サンドイッをELISA柱(ボカローンが体収験でニュアル(超校社サイエンディフェック)(1987)、様生化学契製調品5.免疫生化学研

**役法(東京化学周人)(1988)) 等が挙げられる。**[0 1 7 0] 世光所体社とは、本現朝のポリスプチドを開題内あるいは細胞外に発現した微生物。動物細胞ある。 細胞内あるいは細胞外に発現した微生体。動物細胞ある には国生間音水 たは組織に、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレンシ・インチオンフネート(F 1 T C せい 勢の蛍光物質でラベルした抗マウス 1 8 G抗体あるいは

その哲片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメー

ケーで気沈する方法である。

[0171]酵素免疫固定法(ELISA法)とは、較ポリペプチドを回動内あるいは細胞外に発現した酸生物、動物細胞あるいは異血細胞素では組織に、本発明の近体を反応させ、さらにベルオキンダー社、ピオゲン等の酵素健觀等を施したがマクス!BG抗体あるいは結合の酵素健觀等を施したがマクス!BG抗体あるいは結合

(0172) 放射性物質環境免疫抗体性(RIA)とは、数ボリベブチドを相関内あるいは間間外に発現した 間生物、動物回離あるいは豆母間指定は銀機に、本規明の抗体を反応させ、さらに放射線環線を協した抗マウン」。 G 成体あるいはその断片を反応させる。 免年間 国発合法、党がイングチドを相関内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは 原生細胞を大き性組織、 25ドド I て等の対策が関、 ルオキンダーゼ、ピオチン等の解集環境を強した抗マウス I B C 抗体をあいはその断けを受けます。 25 にド I T C 等の対策物質、 ルオキンダーゼ、ピオチン等の解集環境を強した抗マウス I B C 抗体をあいはその断けを反応させた後、国際総を用いて観察する方法である。

【0173】ウェスタンプロッティング法とは、該ボリペプチドを相関内あるいは田路外に発現した微生物、動物間あるいは自由知智夫なは経命的出位後をSDS・ボリアクリルアミドグル電気(動) (Antibolica-A Laboratory Lings Antical Cold Springfarbor Laboratory (198 の) で分面した後、数グルをPVD 影響とはエトロセルロース膜にプロッチングし、数膜に本質切砂筋ボリペプチドを特質的に影響する抗体を反応させ、さらにFIT (等の蛍光物質、ペルオキンダーゼ、ピオギン等の砂紫電観を施した抗マウス I 8 C抗体あるいはその断片を反応させた後、確認する方法である。

【0174】ドットプロッティング法とは、数ポリペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは異虫細胞または組織の抽出液をニトロセルロース限にプロッティングし、数限に本発明の抗体を反応させ、さらにFITC等の蛍光物質、ペルオキッダーせ、ピオチン等の酵素偏離を施した抗マウス I g C 抗体あるいは結合断片を反応させた後、値程する方法であ

【0175】免疫な降圧とは、本発明のボリペプチドを 距散内あるいは粗陥外に発現した衛生物、動物細胞ある いは昆虫細胞または組織の抽出液を設ポリペプチドを特

異的に配置する抗体と反応させた後、プロテインGーセファロース等イムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体権合体を沈降させる方法である担体を加えて抗原抗体権合体を沈降させる方法であ

【の176】サンドイッチELISA在とは、本発明の ボリペプチドを特別的に配響する抗体で、抗原配離的位 の国なる2種類の抗体のうち、あらかじめー方の抗体を ブレートに吸着させ、もう一方の抗体を下1ての毎 ガインートに吸着させ、もう一方の抗体を下1ての毎 光物質、ベルオキンダーは、ビメチン等の酵素に爆撃し たねさ、抗体吸着プレートに、脱ポリペプチドを細胞内 あるいは細胞がに発現した微生物、動物細胞あるいは良 虫細胞素たは組織の抽出液を反応させた後、爆難した抗 体を反応させ、複離物質に応じた反応を行う方法であ

【の177】(9)本発明のボリペプチドを特異的に起 概する抗体を用いて使用を診断する方法 ヒト生体試料ならびヒト初代培養細胞での、懸ポリペプ チドの発現園の変化ならびに発現しているボリペプチド の構造変化を同定することは、終来、疫苗を発症する 健康や毎に表現した疫母の原因を知る上で有用である。 砂ボリペプチドの発現画や構造液化を検出して診断する がよしては、上配した、蛍光抗体性、酵素免疫値定在 (ELISA注)、放射性物質細酸や疫抗体性、RI (ELISA注)、放射性物質細酸や疫抗体性、RI 等級的性(RELISA注)、かは大タンプロッティングは、ドットプロッティングは、ウェスタンプロッティングは、ドットプロッティングは、ウェスタンプロッティング法、ドットアロッティングは、安安位氏療法、サンドイッチELISA性等が挙げるれる。

自己免疫疾患、移植片対宿主疾患等の異常な免疫細胞の 微生物感染、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、インスリン依 トリンパ編、ポジキン仮、名種リンパ編、成人T 価格ロ 性脳疾患の神経細胞の障害に基力へ疾患、アルツハイト **細胞抽出液が用いられる。また、生体試料から取得した** 存性,非依存性糖尿病、糸球体胃炎、外傷性脳損傷、変 形性関節炎、乾癬、痛風、各種脳脊髄炎、うっ血性心不 全、炎症性関疾患等の感染や炎症を伴う疾患、パーキッ 自成、既在閩海寺の貿洛な笛間坦路を伴り成倒、便在閣 節リウマチ、砂袋糕点等の異格な袋糕が無點や清暖組織 の活性化を伴う疾患、エイズ等のウイルス性疾患、虚血 我人呼吸轉迫症候群 (ARDS:adult respiratory di するDNAの変異が原因となっている疾患の患者より取 のものあるいは、眩生体試料から取得した細胞ならびに 型、動脈硬化・再狭窄等の平滑筋細胞の異常な分化増殖 を伴う疾患、多臓器不全、全身性炎症反応症候群(SI **得した組織、血液、血液、尿、便、腸液等の生体試料を** stress syndrome)等、本発明のポリペプチドをコード **活性化を伴う疾患、エンドトキシンショック、敗血症、** 【0178】上配方法による診断に供する検体として は、アファギー、アトパー、鴨島、花粉館、飲道過数、 一成、パーキソンン依律の神経性間の国動に魅力へ妖 R S : systemic inflammatory response syndrome)

組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として 単離したものを用いることもできる。 [0179]免疫学的に検出する方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA疳・並光后体は、ウェスタンプロットは、免疫超離染色は等が挙げられる。免疫学的に定菌する方法としては、液相中で本契明のポリベチドと反応する抗体のうちエピトープが関なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッドELISA法、19 1年の放射性同位体で細胞した本形的のパリペプチドを基明のポリペイチドを健康する形体を用いスプティと本発明のカリペプチドを健康する形体を用いるデジオイムノアッセイ任等が挙げられる。
[0180](10)本発明のDNAを用いたノックアウト非ヒト動物の作製

本発明のDNAを含有してなる超換えベクターを用い、目的とする非とト動物、例えばウシ、ヒッジ、ヤギ、フタ、ウマ、マクス、ニフトリ等の胚性幹間間(eabryonic stem cell)において、発色体上の本接明のボリペプチドカコードするDNAを公知の相同超換えの手注(例えば、Nature、226, 225 (1987)、Cell、51, 503 (1987)、Nature、226, 235 (1987)、Cell、51, 503 (1987)、Nature、226, 235 (1987)、Cell、51, 503 (1987)、Nature、226, 236 (1987)、Cell、51, 503 (1987)、Nature 226, 236 (1987)、Cell、51, 503 (

ーンを作製する (例えば、hature, 350, 243 (199 1))。 胚性幹細胞の庭型クローンを用い、助物の受損的の妊娠物にある。 250, 243 (199 1)。 胚性幹細胞のピーンを用い、助物の受損的の妊娠を可能力により、任性幹細胞の一ンと正常細胞の発色体の本を表してある。 このキメラ 個体上部運体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のボリベブチドをコードする DN Aに任意の推り合わせにより相同染色体の双方に変異が入ったホモ個体の中から、本発明のボリベブチドをコードする DN Aの発射が一部または完全に抑制された個体として、ックアット非にト助物を得ることができる。

コードするDNAの任意の位置へ変異を導入することに させることも可能である。また、その発現制関領域への 【0181】また、駅色体上の本発明のポリペプチドを より、ノックアウト非ヒト動物を作製することも可能で ある。例えば発色体上の本発明のポリペプチドをコード するDNAの翻駅倒域中へ協議を開換、欠失、挿入等さ せて変異を導入することにより、その産物の活性を改変 組織特異性等を改変させることも可能である。さらにC r e — I o x P 系との組合せにより、より間極的に発現 る。このような例として、脳のある特定の領域で発現さ れるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子 を欠失させた例 (Cell, 87, 131 7, (1996)] やCre 同様な変異を導入することにより、発現の程度、時期、 時期、発現部位、発現価等を制御することも可能であ を発収するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、 器特異的に目的遺伝子を欠失させた例 (Selence, 5335(1997)〕が知られている。

[0182] 従って、県色体上の本羟明のポリペプチド

(28)

非ヒト動物は、任意の時間、任意の国政または任意の部 をコードするDNAについても、このように任意の時期 位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の症 西校をその顧盼倒域や発現制御領域になする、ノックア ウトボヒト動物を作製することができる。 ノックアウト 伏を鶴導することができる。このように、本発明のノッ **クアウト非ヒト動物は、本発明のポリペプチドに起因す** る個々の使用の治療や予防において極めて有用な動物を や組織で発現を制御できる、または任意の抑入、欠失、 デルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食 品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用であ

【0183】 7. 本発明のポリペプサドの寮国導入およ

(1) 本発明のポリペプチドの仮覧導入 び協能改変度配体の追択

**リールズ・イン・ホフキュサー・パイギロシー等に記載 仰人・団換のいかなる方法を用いてもよい。ポリペプチ** ドの欠失・抑入は、数ポリペプチドをコードするDNA をモレキュラークローニング類2版やカレント・プロト された方法により当なDNA断片を欠失させる、あるい **費ポリペプチドに庭園を導入する方法としては、欠失** は適当なDNA断片を挿入させることにより可能であ

ることができる。間投資料体は、ランダムに度料を導入する方法として、例えばError Prone PCR基(Trends In 【OI84】例えば、欠失应囚体であれば、岐DNAの 中で適当な同じあるいは異なる制限酵素サイトを2個見 出し、飲DNAを含んだプラスミド等を市販の飲制阻酔 **敷により消化後、平滑末端であればそのまま、安出末端** リメラーゼにより平滑化し、再連絡させることにより復 ることができる。仰入変異体であれば、平滑末端化後に 過当な二本銭DNAを抑入し、連絡させることにより得 Blotechnology, 1<u>6</u>, 76 (1998)))等を用いることが できる。目的の位置に度料を導入する方法として、度料 を**有したプライマーを用いたPCR法(Nutagenesis and S** ynthes is of Novel Recombinant Genes Using PCR, PC PRINER A LABORATORY MANUAL, 603 (1994)) & SUMEQ uikChange<sup>Ta</sup> Site-Directed Nutagenesis Kit (STRATAGE でおればKlenow Fragment (TaKaRa社製) 等のDNAボ NE社製)等を用いることができる。

[0185] (2) 本発明のポリペプをドの極能改成の 異体の選択

10ることができる。また、NF-\*Bを活住にする刺散 は、数ポリペプチドおよび数ポリペプチドの数異体のキ たかたか フボーケー 笛唇に 導入し、 敷 ボリスプチドパウ レポーター活性を上昇させた度異体を選択することによ り、NF-\*B洛性化関船を上昇した機舶改成度関係を 2.に配載した方法に帰じて、NF-×B活性化に対す (1) で作製した核ポリペプチドの変異体より、上配 る活性上昇改度産賃体の選択が可能である。具体的に

字在下でNF- k B 活性化を抑制する数ポリペプチドの **変異体を選択することにより、ドミナントネガティブ変 異体を得ることができる。** 

田間フセプター抗体、抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗 CD28杭体、Caイオノフォア)、B価配マイトジェ 【0186】具体的には、散ポリペプサドの整異体をフ NF-B, 1L-1a, 1L-1B, 1L-2, L1F ン (抗 I BM抗体、ant I – CD 4 0) 、ロイコトリ エン、LPS、PMA、寄生体感染、ウイルス感染(H ポーター面配に導入し、サイトカイン(TNFーa、T IV-I, HTLV-I, HBV, EBV, CMV, H デノウイルス等)、ウイルス癌物(二本観RNA、TB x、HBX、EBNA-2、LMP-1等)、DNA股 類物質類、タンパク質合成インヒピター類(例えばシク ロヘキシミド)、紫外線、放射線、酸化ストレス等のN FIxBを活性化する刺激を与え、レポーター活性が変 異体を導入していない時よりも低下した数ポリペプチド の度異体を選択することにより、ドミナントネガティブ **ゆ)、「苗間トムトジョン(花刷ぎ破、フクチン、だ** SV-1、HHV-6、NDV、センダイウイルス、ア 仮以体を得ることができる。

は、炎症広答抑制や現性細胞の増強抑制に応用可能であ 【0181】剤、穏られたドミナントネガティブ変異体 り、眩ドミナントネガティブ変異体をコードするDNA は、NF-xBの活性化を伴う疾患の遺伝子治療に利用 できる可能性がある。以下に実施例をあげて、本発明を 具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のた めのものであり、本発明の技術的範囲を制限するもので (Dominant Negative mutants:便性機能抑制宽與体) ばない。

[0188]

【英施例】【英施例1】ヒト大闘およびヒト酌助組織由 来完全長c DNAライブラリーの作製

ヒトの大闘ねよび即防組織より、モレキュラー・クロー 精製した。それぞれのpolyA.RNAよりオリゴキ Aライブラリーを作製した。011go-cap linker (配列母 写||1||) および011go dTprimer (配列番号12)を用 200. 149-156 (1997)に配載の方法に従って、BAP(B acterial A Ikaline Phosphatase) 処理、TAP(Toba 類一観cDNAの合成とRNAの除去を行った。ほられ プライマー (配列番号14) の2種のプライマーを用い るPCRにより二本鎖cDNAを増幅し、Sfilr的 ャップ法 (Gene, 138, 171-174 (1994)) によりこDN ニング算2版に配載の方法によりmRNAを抽出した。 さらに、オリゴdTセルロースでpolyA・RNAを た粧一銭cDNAを貸型として、5.米糖園のセンスプ **ウイヤー (配列番号13) と3.米格風のアンチセンス** 所した。PCRは、市版のキット:GeneAmp X い、斑白質核酸酵素,4<u>1</u>,197-201(1996)またはGene. cco Acid Phosphatase) 処理、RNAライゲーション、

5でで5分間熱処埋後、95でで1分間、58でで1分 間および12℃で10分間の反応サイクルを12回繰り [0189] Urallir的断したヘクターpHE18SFL L PCRキット (Perkin Elmer社製) を使用して、9 返し、その後4℃で保持することにより行った。

3 (GeneBank AB009864、発現ベクター, 3392bp) に上配 増幅cDNAを挿入し、cDNAライブラリーを作製し クエンシング試薬 (Dye Terminator Cycle SequencingF S Re ady Reaction Kit, dRhodomine Terminator Cycle Sequencing FS ReadyR eaction KitまたはBigDye Term Inator Cycle Sequencing FS Ready ReactionKit, PE B PRISM 377, PE Blosystems社製)を用いて塩基配列を決 て、c DNAの5. 籍と3. 籍の協制配列を、DNAシー iosystems社製)を用い、マニュアルにしたがってシー クエンス反応を行った後、DNAシークエンサー (ABI た。 得られたクローンのプラスミドDNA各々につい

【0190】 [実施例2] NF-xBエンハンサーによ りルシフェラーゼ活性が発現制御されるレボーター細胞 株の部内

1 FN-β中のNF-×B配職配列(配列番号15)を 3回繰り返した人工プロモーターを作製し、ルシフェラ -- ガフボーケーくクター (pAGE-1nc:特別中3-22979、状 数医学, 1,96-103 (1989))のルシフェラーゼ選 伍子の5.上前域に挿入した(以後、plF·lucとよぶ)。 餃プラスミド 4μgを1μg/μ1となるようにTE榎 衛後 (10 mmol/1トリスーHC1 (pH8.

法(BIO-RAD社製:Gene Pulser®)によって、ヒト野組 配株293 (Clontech社製) 1.6×10f個に遺伝子導 TNFーa刺散によって、無刺激と比較して670倍と 0)、1 mmol/l EDTA (エチレンジアミン4 弊数ナトリケム) 〕 に添解し、 エフケトロポワーション 耐性遺伝子を含んでおり、遺伝子導入後は、ハイグロマ よリツンソG、250/m1ストフプトレイツン)で茹 後、293/IF-UCとよぶ)し、以下の発現アッセイに 養、ハイグロマイシンを遺伝子導入の選択マーカーとし イシン0.2g/1を存在したRPM1倍也 (RPM11 640 (日本水産社製)、10% 子牛血清、0,05 mmol/!-メルカプトエタノール、25 U/ml て安定形質転換株を樹立した。安定形質転換株のうち、 入した。plF-lucは、ハイグロマイシン (Hygromycin) いう高いルシフェラーゼ活性を誘導した株を選択 (以

後、菌体を遠心分離機で回収し、プラスミド酮製キット 【0191】 [実施例3] 293/1F-LUCを用い **奥施例1で塩基配列を決定したクローンを、アンピシリ** ン (100 mg/l) を添加した2×YT増档 (Yenst ex tract 10 g/l, Trypton 16 g/l, NaC 5g/l) 2 m 1中、37℃で、16時間、各々振躍培養した。培養 た完全長DNAのNFー×B活性化に対する解析

エルプレートに293/IF-LUC笛覧を I ウエルち m. Packar社製)とルシフェラーゼ活住側定装置 (ARVO **に添付資料の方法で各々プラスミドを問製した。96ウ** 集細胞に、上配プラスミド約0.25μgをそれぞれり t. GIBCO BRL社製)を用いて、添付資料の方法に従って (QIAPrep96 Turbo Winiprep Kit, QIACEN社製)を用い 導入した。31℃で、16時間、CO2インキュベータ 1420 MULTILABEL COUNTER, WALLC社製の を用いて、ル たり20,000個となるように分注し、37℃で,1 6時間、C01人ンサコペーター中で拍響した。 20倍 一中で協養後、ルシフェラーゼ活性拠定試薬(LucLite ポフェクション試業 (LIPOFECT AWINE 2000™ Reagen シフェラーゼ活性を順定した。

(配列番号10の塩基配列を有するDNAクローン)の 3. 0倍の活性が値配された。肢クローンより、本発明 NAクローン)、ADSU00701 (配列番号の塩 各クローンのプラスミドを導入した場合において、それ の塩基配列を有するDNAクローン)、COLO611 ADKA01604 (配列語号8の塩基配列を有するD ぞれネガティプコントロール (pWE18SFL3を使用) と比 2 (配列番号7の塩基配列を有するDNAクローン)、 **基配列を有するDNAクローン)、CAS01989** 校して12、5倍、6、3倍、4、4倍、2、7倍、 のDNAを各々取得した。

[0192] その結果、COL03279 (配列番号6

【0193】 [実施例4] 本発明のDNAの各種臓器に おける発現面の検出

発明のDNAの各種凝器における発現量の定量を、定法 半定義的PCR佐を用い、以下のように行った。また、 どの細胞でも何包度発現していると考えられるグリセル hyde-3-phosphate dehydrogenase: G 3 P D H)の転耳 産物の定量を同時に行ない、細胞間でのm R N A 重め返 COL03279, COL06772, ADKA016 04、ADSU00701の各クローンに配められる本 アルデヒドー3ーリン酸デヒドロゲナーゼ (glyceralde いや、サンプル間での逆転与酵素によるmRNAから一 本顔 c DNAへの変換効率に大型ないことを確認した。 【0194】ヒト賦器由来のmRNA (Clontech社製: **胃間、8時間、9脳下垂体、10小側、11骨柱、12** (PCR Protocols, Academic Press (1990)等) に従い、 1即臂、2脑、3尾状核、4海馬、5無質、6 机床、7

21時、22リンパ節、23乳腺、24胎盤、25的立 5子島) からc D N A 合成キット (SUPERSCRIPI<sup>TI</sup> Pres mplification System: BRL社製)を用いて、一本顔にD を合成し、水で240倍格釈してPGRの鋳型として使 欧、26唾液酸、27骨格筋、28脊縄、29脾賦、3 0四、31桁県、32胸腺、33甲杉腓、34気管、3 NAを合成した。1μgのmRNAから一本鎖c DNA 職、17胎児肝臓、18胎児肺、19心臓、20肝臓、

扁桃体、13小椒、14脳緊、15胎児艇、16胎児腎

校開2001-352986

[0197] rase (GeneTaq) と孫(すの I O X Gene Tag Universal Bu fferおよび 2. 5 mmol/id N T P M I X t u r eを用 7、C0106772か5の協権配列情報に裁力いた配 列番号18 および19、ADKA01604からの協議 配列情報に基づいた配列番号20ねよび21、ADSU 00701からの協感配列情報に基づいた配列番号22 は、コッポンジーン社数のRecombinant Tag DNA Polyme 0サイクル行った。反応液をアガロースゲル電気泳動法 **用した。PCR用プライマーとしては、COL0327** 9からの協議配列債額に基づいた配列指導16 および1 製のサーマル・サイクラーを用いて、94℃で30秒間、80℃で1分間、72℃で2分間の反応を26~3 9. COL06772, ADKA01604, ADSU いて、説明癖に従って行った。MJ RESERCH社 および23に配配の合成DNAを用いた。PCR反応 [0195] 稍果を図1~4に示す。COL0327 は、各クローン、各臓器によって強弱の怠はあるもの 007010各クローンに認められる本発明のDNA およびエチジウムプロマイド染色により解析した。 の、検討した35億全ての臓器で発現していた。

一、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患、移植片対 **育主侠想等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、エン** ドトキシンショック、吸血値、観出物感味、便転8型肝 府、糸球体臂炎、外傷性脳損傷、乾癬、清風、各種脳等 相及、うっ血性心不全、故症性間疾患等の感染や故症を 伴う疾患、パーキットリンパ腫、ホジキン病、各種リン パ間、成人「和粒白血体、現性腫瘍等の具体な細胞は発 を伴う疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節炎等の異常 な様様芽細胞や滑興組織の活性化を伴う疾患、エイズ等 のウイルス性疾患、適血性脳疾患の神経細胞の障害に基 ムへ統断、アラシスイトー位、スーキソンソ仮称の存品 【略明の効果】本発明によれば、アレルギー、アトビ 以、慢性C型肝炎、インスリン位存性・非依存性物尿

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. <120> Novel polypeptide SEQUENCE LISTING

<130> H12-0641J5

÷

<170> Patentin Ver. 2.1 <160> 21

<210>

[0199]

<211> 780 <212> PRF <213> Homo saptens

-<del>4</del>00+

Het Ala Ser Ala Glu Leu Gln Gly Lys Tyr Gln Lys Leu Ala Gln Glu

A、数DNAを用いた遺伝子治療、核ポリペプチドを配置する抗体、核ポリペプチドの活性上昇改変体、核ポリ 価数の厚部に越力へ叙想、動脈硬化・耳状皆等の中液筋 細胞の異常な分化増殖を伴う疾患、多臓器不全、全身性 设度反抗结核群(SIRS:syste mic inflammatory r esponsesyndrome)、成人呼吸的迫症候群(ARDS:a dult respiratory distress syndrome)等の治療薬の探 素、開発に有用なポリペプチド、核ポリペプチドをコー ペプチドのドミナントネガティブ変異体、およびこれら ドするDNA、酸DNAのアンチセンスDNA/RN の利用法を提供することができる。

配列番号11一人工配列の説明:合成NAA(オリゴキャ 【配列表フリーテキスト】 ップリンカー配列)

配列番号12一人工配列の説明:合成DNA(オリゴdffブ

配列番号13-人工配列の説明:合成DNA (5.末端回の ライマー配列)

配列番号14-人工配列の説明:合成DNA (3.末端回の アンチセンスプライマー配列) センスプライマー配列)

[0196]

配列番号 15-人工配列の説明(転写因子NF-x 結合配

配列番号 1 6 一人工配列の説明: 合成DNA (組織発現分

布を検討した台成プライマー配列)

配列番号17一人工配列の説明:合成DNA 配列番号:8一人工配列の説明:合成DNA 配列番号 I 9 一人工配列の説明:合成DNA

配列番号20一人工配列の説明:合成DNA 配列番号21一人工配列の説明:合成DNA 配列番号22-人工配列の説明: 合成DNA 配列番号23一人工配列の説明: 合成11/1/1

9

dia Leu Se r Giu Pro Arg Gly Lys Lys Asn Lys Lys Ser Gly Giu Ser Tyr Ser Lys Leu Arg Ala Gin Asn Gin Val Leu Lys Lys Gly Val Val Asp Glu Gin Ala Asn Ser Ala Ala Leu Lys Glu Gin Leu Lys Net Lys Asp Gin Ser Leu Arg Lys Leu Gin Gin Het Asp Ser Leu Thr Phe Arg Asn Leu Gin Leu Ala Lys Arg Val Glu Leu Leu Gin Asp Glu Leu Ser Ser Gin Leu Ser Gin Giu Gin Lys Ser Val Phe Asp Glu Asp Leu Gin Lys Lys 11e Clu Giu Asn Giu Arg Leu His 11e Cin Phe Phe Clu Ata Asp Clu Cin His Lys His Val Clu Aia Clu Leu Arg Ser Arg Leu Glu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Glu Glu Ser Leu Ser II e Ile Asn Glu Ala Thr Leu Giu Thr Giu Ala Aia Gin His Gin Aia Vai Vai Asp Giy Leu Thr Arg Lys Tyr Net Glu Thr IIe Glu Lys Leu Gln Asn Asp Lys Ala Lys Leu Glu Vai Lys Ser Gin Thr Leu Glu Lys Giu Ala Lys Glu Cys Arg Leu Arg Thr Glu Glu Cys Gln Leu Gln Leu Lys Thr Leu His Lys Val Pro Phe Asn Asp Thr Lys Tyr Ser Gin Tyr Asn Ala Leu Asn Val Pro Leu His Asn Arg Arg His Cln Leu Lys Net Arg Asp 11e Ala Gly Gin Ala Leu Ala Phe Val Gin Asp Leu Val Thr Ala Leu Leu Asn Phe His Thr Tyr Thr Glu Gin Arg lie Gin lie Phe Pro Val Asp Ser Ala lle Asp Thr He Ser Pro Leu Asn Gln Lys Phe Ser Gln Tyr Leu His Giu Asn Ala Ser Tyr Val Arg Pro Leu Giu Giu Giy Het Leu His Leu Phe Glu Ser lle Thr Clu Asp Thr Val Thr Val Leu Clu Thr Thr Val Lys Leu Lys Thr Phe Ser Clu His Leu Thr Ser Tyr lie Cys Phe Leu Arg Lys 11e Leu Pro Tyr Gin Leu Lys Ser Leu Giu Giu Giu Cys Giu Ser Ser Leu Cys Thr Ser Ala Leu Arg Ala Arg Asn Leu Glu Leu Ser Gin Asp Wet Lys Lys Wet Thr Ala Val Phe Giu Lys Leu Gin Thr 125 2 155 52 202 2 280 135 295 2

(35)

<213> Homo sapiens

<210> 2 <211> 153 <212> PRT

Ser Leu Ser Tyr Gly Pro Lys Ala Ala Ser Gly Phe I ie Ser Pro Leu 500 505 Ser Ala Glu Con Loo 1-00 -Tyr lie Ala Leu Leu Ala Leu Pro Ser Thr Giu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Thr Asn Tyr Ser Ser Val Leu Thr Asn Val Gly Ala Ala Leu His 420 420 Cly Phe His Asp Val Wet Lys Asp IIe Ser Lys Ris Tyr Ser Cin Lys Leu Ala Asn Arg Arg Ite Leu Leu Ser Ser Thr Giu Ser Arg Giu Giy 545 550 550 560 Leu Ala Gin Gin Vai Gin Gin Ser Leu Giu Lya Ite Ser Lya Leu Giu 565 570 570 Thr Ala Ciy Cin Asp Giu Ala Thr Ala Lys Ala Val Leu Ciu Pro Lie 625 630 630 640 Ala Ala Ile Glu His Giu Leu Pro Thr Ala Thr Gin Lys Leu lle Thr Thr Asn Asp Cys lie Leu Ser Ser Val Val Ala Leu Thr Asn Gly Ala 480 475 470 480 Ser Ala Giu Cys Wet Leu Gin Tyr Lys Lys Lys Ala Ala Ala Tyr Wet Lys Ser Leu Arg Lys Pro Leu Leu Glu Ser Val Pro Tyr Glu Glu Ala 530 540 Gin Ciu Lys Ciu His Trp Net Leu Giu Aia Gin Leu Aia Lys Iie Lys 580 580 Leu Giu Lys Giu Asn Gin Arg lie Ala Asp Lys Leu Lys Asn Thr Gly 595 600 Ser Ala Cin Leu Val Gly Leu Ala Cin Ciu Asn Ala Ala Val Ser Asn Gin Ser Thr Ser Leu IIe Gly Thr Leu Thr Arg Thr Ser Asp Ser Glu 645 650 Val Pro Asp Val Glu Ser Arg Glu Asp Leu Ile Lys Asn His Tyr Net Ala Arg Ile Val Glu Leu Thr Ser Gin Leu Gin Leu Ala Asp Ser Lys Ser Val His Phe Tyr Ala Giu Cys Arg Ala Leu Ser Lys Arg Leu Ala 690 700 Lev Ala Giu Lys Ser Lys Giu Ala Lev Thr Giu Giu Net Lys Lev Ala 705 715 Ser Gin Asn He Ser Arg Leu Gin Asp Giu Leu Thr Thr Thr Lys Arg 735 730 Asn Giu Thr Leu Ser Lys Gin Arg Giu Giu lie Asp Thr Leu Lys Wet 766 Ser Tyr Glu Asp Gin Leu Ser Net Net Ser Asp His Leu Cys Ser Net Ser Ser Lys Cly Asn Ser Lys Lys Asn Lys Ser Arg 770 775 775 **Q** 535

Clu Val Cin He Val Clu Clu Ala Thr Cin As n Ala Ciu Giu Cin Pro Het Leu Lys Ala Ser Ala Aia Ser Pro Ala Val Ala Leu Lys Ala Leu Ser Thr Phe Ser Giu Asn Giu Tyr Asp Ala Ser Trp Ser Pro Ser Trp 35 40 Val Net Trp Leu Gly Leu Pro Ser Thr Leu His Ser Cys His Asp lie 50 60 Val Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Cly Ser Trp Cly Phe Ser 11e Val Cly 65 75 80 Cly Tyr Clu Giu Asn His Thr Asn Cin Pro Phe Phe 11e Lys Thr 11e Val Leu Ciy Thr Pro Ala Tyr Tyr Asp Ciy Arg Leu Lys Cys Ciy Asp 100 Net lie Val Aia Val Asn Gly Leu Ser Thr Val Gly Wet Ser His Ser , so the Lys Thr Clu Lys Clu Phe Wet Cln His Ala Arg Lys Ala Cly SO and SS Ala Leu Vai Pro Met Leu Lys Glu Gln Arg Asn Lys Vai Thr Leu Thr Net Ala Ala Pro 11e Pro Gin Gly Phe Ser Cys Leu Ser Arg Phe Leu Gly Trp Trp Phe Arg Gln Pro Val Leu Val Thr Gln Ser Ala Ala 11e Val Pro Val Arg Thr Lys Lys Arg Phe Thr Pro Pro 11e Tyr Cln Pro Thr Ala Cly 11e Phe Asp Ala Tyr Val Pro Pro Clu Cly Asp Ala Arg lle Ser Ser Leu Ser Lys Glu Cly Leu lle Glu Arg Thr Glu Arg Wet Lys Lys Thr Wet Ala Ser Cin Val Ser He Arg Arg He Lys Asp Tyr Leu Val IIe Pro Pro Clu Lys Ser Asp Arg Ser IIe His Leu Ala Cys 65 75 75 80 Asp Ala Asn Phe Lys 11e Lys Asp Phe Proicity Lys Ala Lys Asp 11e Val 11e Cys Trp Pro Gly Ser Leu Val 145 <213> Homo sapiens <210> 3 <211> 306 <212> PKT <400>3

[020]

[0200]

(33

特開2001-352986

His Thr Leu Val Thr Glu His Cys Phe Pro Asp Net Thr Trp Asp Lie 170 Lys Tyr Lys Thr Val Arg Trp Ser Phe Val Giu Ser Leu Glu Pro Ser 180 180 Phe 11c Giu Ala H1s Leu Cys Leu Asn Asn Ser Asp H1s Asp Arg Leu 145 150 150 180 180 190 His Val Val Gin Val Arg Cys Ser Ser Wet Wet Asn Gin Gly Asn Val Tyr Cly Cin Lie Thr Val Arg Net His Thr Arg Cin Thr Leu Aia Lie 210 210 Tyr Asp Arg Phe Cly Arg Leu Wet Tyr Cly Cln Glu Asp Val Pro Lys 225 235 240 Asp Val Leu Clu Tyr Val Val Phe Clu Lys Cln Leu Thr Asn Pro Tyr 250 255 Gly Ser Trp Arg Wet His Thr Lys lie Val Pro Pro Trp Aia Pro Pro Lys Cin Pro Lie Leu Lys Thr Val Met 11e Pro Cly Pro Cin Leu Lys Pro Clu Glu Glu Tyr Glu Glu Ala Gln Gly Glu Ala Gln Lys Pro Gln 290 300 200

[0203]

Clu Cin Arg Ile Cin lie Phe Pro Val Asp Ser Ala Ile Asp Thr 11e Tyr Val Arg Pro Leu Giu Giu Giy Wet Leu His Leu Phe Giu Ser lle 145

Thr Gly Val Ser Cys Arg Val Cys Lys Val Ala Thr His Arg Lys Cys

Glu Ain Lys Vai Thr Ser Aia Cys Gin Aia Leu Pro Pro Vai Giu Leu Atg Arg Asn Thr Ala Pro Val Arg Arg Ile Glu His Leu Gly Ser Thr Lys Ser Leu Asn His Ser Lys Gin Arg Ser Thr Leu Pro Arg Ser Phe Ser Lew Asp Pro Lew Net Glu Arg Arg Trp Asp Lew Asp Lew Thr Tyr Val Thr Glu Aig He Leu Ala Ala Ala Phe Pro Ala Arg Pro Asp Glu Cln Arg His Arg Cly His Lev Arg Clu Leu Ala His Val Leu Cln Ser lys His Arg Asp Lys Tyr Leu Leu Phe Asn Leu Ser Giu Lys Arg His

Net Lys Pro Arg Lys Ala Glu Pro His Ser Phe Arg Glu Lys Val Phe At B Lys Lys Pro Pro Val Cys Ala Val Cys Lys Val Thr 11e Asp Cly

<213> Hoso saptens

<400>

<211> 261 <212> PRT

<210> 4

3

Asp Leu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Val Gin Asp Phe Gly Trp Pro Glu

Leu His Ala Pro Pro Leu Asp Lys Leu Cys Ser ile Cys Lys Ala Net

Glu Thr Trp Leu Ser Ala Asp Pro Gin His Val Val Val Leu Tyr Cys

Lys Val Gly Gin Asp Leu Gly Phe Pro Gly Ala Trp Arg Phe Gin Val

Ser Leu Clu Leu Pro Asp Pro His Pro Cys Leu Ser Val Cys Gin Giy 225 235 240

Asn Lys Gly Lys Leu Gly Val 11e Val Ser Ala Tyr Wet His Tyr Ser

Lys Ile Ser Ala Gly

<213> Homo sapiens <211> 615 <212> PRT

Net Giu Thr ile Giu Lys Leu Gin Asn Asp Lys Aia Lys Leu Giu Val <400> 5

Lys Ser Gin Thr Leu Giu Lys Giu Ala Lys Giu Cys Arg Leu Arg Thr

Clu Glu Cys Gln Leu Gln Leu Lys Thr Leu His Glu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Glu Glu Ser Leu Ser 11e 11e Asn Glu Lys Val Pro Phe Asn

Asp Thr Lys Tyr Ser Arg Tyr Asn Ala Leu Asn Val Pro Leu His Asn

Arg Arg His Gin Leu Lys Met Arg Asp lie Ala Gly Gin Ala Leu Ala Phe Val Cln Asp Leu Val Thr Ala Leu Leu Asn Phe His Thr Tyr Thr

Ser Pro Leu Asn Gln Lys Phe Ser Gln Tyr Leu His Glu Asn Ala Ser

The Ciu Asp Thr Vai Thr Vai Leu Ciu Thr Thr Vai Lys Leu Lys Thr 160 170 170 175 175 Phe Ser Glu His Leu Thr Ser Tyr IIe Cys Phe Leu Arg Lys IIe Leu

Pro Tyr Gin Leu Lys Ser Leu Giu Giu Giu Cys Giu Ser Ser Leu Cys Thr Ser Ala Leu Aig Ala Aig Asn Leu Glu Leu Ser Gln Asp Wet lys

[0202]

Leu Ala 305

Pro Leu Ceu Ciu S er Val Pro Tyr Ciu Ciu Aia Leu Aia Asn Arg Arg lys Wet Thr Ala Val Phe Giu Lys Leu Gin Thr Tyr 11e Ala Leu Leu 225 Ain Leu Pro Ser Thr Giu Pro Asp Gly Leu Leu Arg Thr Asn Tyr Ser Ser Val Leu Thr Asn Val Cly Ala Ala Leu His Cly Phe His Asp Val Glu Leu Pro Thr Ala Thr Gln Lys Leu Ile Thr Thr Asn Asp Cys Ile Pro Lys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Ser Pro Leu Ser Ala Glu Cys Wet Leu Gin Tyr Lys Lys Lys Ala Ala Ala Tyr Wet Lys Ser Leu Arg Lys Wet Lys Asp He Ser Lys His Tyr Ser Gin Lys Ala Ala He Glu His Leu Ser Ser Val Val Ala Ser Thr Asn Cly Ala Gly Lys 11e Ala Ser 305 315 Phe Phe Ser Asn Leu Asp Tyr Phe 11e Ala Ser Leu Ser Tyr Gly 335 336 Trp Net Lev Glu Ala Gln Leu Ala Lys 1te Lys Leu Glu Lys Glu Asn lie Leu Leu Ser Ser Thr Giu Ser Arg Ciu Giy Leu Ala Gin Gin Val 385 395 400 Cln Cln Ser Leu Clu Lys He Ser Lys Leu Clu Cln Clu Lys Clu His Cin Arg 11e Ala Asp Lys Leu Lys Asn Thr Ciy Ser Ala Gin Leu Val Ser Arg Glu Asp Leu lle Lys Asn Arg Tyr Wet Ala Arg lle Val Glu Arg Leu Gin Asp Giu Leu Thr Thr Ihr Lys Arg Ser Tyr Giu Asp Gin Gly Leu Ala Gin Glu Asn Ala Aia Vai Ser Asn Thr Ala Gly Gin Asp Giu Ala Thr Ala Lys Ala Val Leu Giu Pro lle Gin Ser Thr Ser Leu lle Cly Thr Leu Thr Arg Thr Ser Asp Ser Glu Val Pro Asp Val Glu Lew Thr Ser Gin Lew Gin Lew Ala Asp Ser Lys Ser Val His Phe Tyr Ata Glu Cys Arg Ata Leu Ser Lys Arg Leu Ata Leu Ata Glu Lys Ser Lys Glu Ala Leu Thr Glu Glu Het Lys Leu Ala Ser Gln Asn 11e Ser Leu Ser Net Net Ser Asp His Leu Cys Ser Net Asn Giu Thr Leu Ser Lys Gin Arg Giu Giu lie Asp Thr Leu Lys Wet Ser Lys Gly Asn ₽ **5**92 345 360 Ser Lys Lys Asn Lys Ser Arg 245

aa giggagga ggaggcgcgg cggcggcggc ggcggcggci gcggig gcca agcaggcaga 60 tactgactga acegitaceg 88agcgigle igggitiggg 89sgggmaan aggatgaga. 120 gacigggegg aceggactgi acggggrggg ggaggac aig gac teg gat gng 175 cag gag ang tac cag ang ctg gct cag gag tac tcg ang ctt cgg gct Gin Giy Lys Tyr Gin Lys Leu Ala Gin Giu Tyr Ser Lys Leu Arg Ala Het Ala Ser Ala Glu Leu cag aat cag git cig aaa aag ggt git gig gat gaa caa gca aat ict Gin Asn Gin Val Leu Lys Lys Ciy Val Val Asp Giu Gin Ala Asn Ser 30 35 cta caa cag gaa atg gac agt ttg aca ttt cga aat ctg cag ctt gcc Leu Gin Gin Giu Wet Asp Ser Leu Thr Phe Arg Asn Leu Gin Leu Ala 55 60 70 nat gan cgg ttg cat ata caa ttt ttt gaa gct gat gag cag cac aag Asn Glu Årg Leu His lie Gin Phe Phe Glu Ala Asp Glu Gin His lys 120 130 gca gct tta aag gag caa ctg aaa atg aag gat cag tca ttg aga aaa Ala Ala Leu Lys Glu Gln Leu Lys Wet Lys Asp Gln Ser Leu Arg Lys ang agg gta gan cta ctt can gat gan cta gct cta agt gan cca cgn Lys Arg Val Glu Leu Leu Gln Asp Glu Leu Ala Leu Ser Glu Pro Arg ggc aug aan aac aag aaa agt gga gan tet tet tet cag tig agt ean Gly Lys Lys Lys Lys Ser Gly Glu Ser Ser Gln Leu Ser Gln gag cag aag agt gic itt gat gaa gai cig caa aag aag ata gaa gag Giu Gin Lys Ser Val Phe Asp Giu Asp Leu Gin Lys Lys lie Giu Giu cat gig gaa gca gog cig agg agt cga ctg gcc act cig gog aca gaa His Val Ciu Aia Ciu Leu Arg Ser Arg Leu Aia Thr Leu Ciu Thr Ciu 135 145 150 gaa acc att gag aag ctg cag aac gac aag gct aan cta gaa gtg amm Giu Thr lle Giu Lys Leu Gin Asn Asp Lys Ala Lys Leu Giu Val Lys gea gee eag eac eas get gtg gtt gae ggt ete ace egg aag tae atg Ala Ala Cin His Cin Ala Val Val Asp Ciy Leu Thr Arg Lys Tyr Wet = \$ <213> Homo sapiens <222> (158) .. (2497) 105 <211> 3168 <221> CDS <212> DNA 610 <210> 6 9 <220> [0204]

367

415

463

21

559

60

655

703

751

cag act cta gaa aag gaa gcc ang gaa tgt cga ctt cga acg gaa

23

271

319

atc ctg

50

tgt atc o

1615

1663

Ξ

ctt tea get gaa tge atg eta Leu Ser Ala Glu Cys Wet Leu

1759

1807

ctg gea aac ege ege ate Leu Ala Asn Arg Arg He

1855

1903

1951

8 5

1999

2047

cag gat gaa Gla Asp Clu

2095

630

2143

2191

ž š

2239

8cc N a

ž ½

2287

Raig Lys 710

ير ن

特開2001-352986

ctt etc agc tet act gaa ogt ega gaa gge ett gea cag caa git caa Leu Leu Ser Ser Thr Giu Ser Arg Giu Giy Leu Ala Gin Gin Vai Gin 555 560 560 ttc agc aac aat itg gac tac tic ait get tea eig agc tat gga eet Phe Ser Asn Asn Leu Asp Tyr Phe IIe Ala Ser Leu Ser Tyr Cly Pro 490 500 tca tca gta gtg gca tta aca aat gga gca gga aag att gca tcc ttc Ser Ser Val Val Ala Leu Thr Asn Gly Ala Gly Lys lle Ala Ser Phe cog tat aag aaa aaa gct gct gcc tat atg aag tct ttg aga aag ccc Gin Tyr Lys Lys Lys Ala Ala Ala Tyr Wet Lys Ser Leu Arg Lys Pro 520 530 cag agt tig gaa aag att tot aaa cig gag cag gaa aaa gaa cat igg Gin Ser Leu Giu Lys lie Ser Lys Leu Giu Gin Giu Lys Giu His Trp 570 580 cga att gca gat aag ctg aag aat aca ggt agt gcc cag ctg gtt ggg Arg lie Ala Asp Lya Leu Lya Aan Thr Cly Ser Ala Cin Leu Val Cly 600 605 aca tot gac agt gag gtt cca gat gtg gaa tot Thr Ser Asp Ser Clu Val Pro Asp Val Glu Ser gec aca get aag get gtg gag eec att eag age ace agt eta att Ala Thr Ala Lys Ala Val Leu Glu Pro lle Gln Ser Thr Ser Leu lle aig tig gaa gca caa tta gcc aaa atc aag cta gog aaa gaa anc ( Net Leu Clu Ala Cln Leu Ala Lys 11e Lys Leu Clu Lys Clu Asn ( 585 595 cgt gaa gac tta att aaa aat cac tac atg gca agg ata gtg gaa Arg Glu Asp Leu lle Lys Asn His Tyr Net Ala Arg Ile Val Glu ctg gcc cag gaa aat gct gct gtg tca aat act gct ggc cag Leu Ala Cin Ciu Asn Ala Ala Val Ser Asn Thr Ala Cly Cin 615 625 cag ttg cag ctg get gac agt ang ten gtg eat tit Gin Leu Gin Leu Ala Asp Ser Lys Ser Val His Phe non aga cig gcc tig gct gan ang Lys Arg Leu Ala Leu Ala Glu Lys ctt cca aca gca aca cag aag ctg ata aca act aat gac Leu Pro Thr Ala Thr Gin Lys Leu lie Thr Thr Asn Asp ( 455 aag gca gcg agt gga ttc att agt cct ctt Lys Ala Ala Ser Cly Phe lle Ser Pro Leu ete tig gag tet gig eet tat gaa gaa gea Leu Leu Clu Ser Val Pro Tyr Clu Clu Ala 535 540 655 445 t tta acc agg aca t r Leu Thr Arg Thr S cgagcactg tot m Arg Ala Leu Ser Ly 635 49 걸 Ser 680 tgc Cys 61.y 1039 1087 1135 1183 799 1375 847 895 943 1231 1279 1327 1423 1519 991 147 Access hat agg cag tae anc gct ctg anc gtt cca ctc cac ant agg Thr Lys Tyr Ser Gin Tyr Asn Ala Leu Asn Val Pro Leu His Asn Arg 235 246 246 Agg acc cag ctg ang atg cga gat att gct ggg cag gcc ctg gct ttt Arg His Gin Leu Lys Wet Arg Asp IIe Ala Gly Gin Ala Leu Ala Phe 250 260 tta gog goa tee tta tea ate ate aat gaa aaa gta eet titt aat gat Leu Giu Giu Ser Leu Ser 11e 11e Aan Giu Lys Val Pro Phe Aan Asp 215 220 220 230 gtc cgc cct ctt gng gaa gga atg ctt cat tta ttt gaa agt atc act Val Arg Pro Leu Clu Glu Gly Net Leu His Leu Phe Glu Ser Ile Thr 320 s aac tac agt tot r Asn Tyr Ser Ser Ser Gin Thr Leu Giu Lys Giu Ala Lys Giu Cys Arg Leu Arg Thr Giu git cag gat cit gig acg get cit cia aac tit cat acc tac aca gaa Val Gin Asp Leu Val Thr Ala Leu Leu Asn Phe His Thr Tyr Thr Giu cag agg att caa att tit cct git gat ict goc att gac act ata ict Gin Arg lie Gin lie Phe Pro Val Asp Ser Ala lie Asp Thr lie Ser gag gat act gig act gic tig gag aca act gig aaa tig aaa act tit Giu Asp Thr Val Thr Val Leu Ciu Thr Thr Val Lys Leu Lys Thr Phe 330 340 tca gas cac tta acc tcc tac ata tgt ttt ctt agg ang att ctt ccc. Ser Giu ilis Leu Thr Ser Tyr 11e Cys Phe Leu Arg Lys 11e Leu Pro 345 350 350 Ser Ala Leu Arg Ala Arg Asan Ceta gang cug tocc cang gae atig ana ana
Ser Ala Leu Arg Ala Arg Asan Leu Glu Leu Ser Cin Asp Wet Lys Lys
375
380
380
387
387
387
387
484 Thr Ala Val Phe Glu Lys Leu Cin Tyr Lie Ala Leu Leu Ala
395
400
405 gan tee tet ett tge nen Glu Ser Ser Leu Cys Thr ttt cat gac gtt atg Phe His Asp Val Wet gna tgt caa tta cag tta aag act cit cat gna gat tig tca ggt i Giv Gys Gin Lev Gin Lev Lys Thr Lev His Giv Asp Lev Ser Ciy i 200 ata gag cat g gat att tcc ana cat tat agt can ana gct gca ata Asp lie Ser Lys His Tyr Ser Gin Lys Ala Ala lle tig cea agt aca gag cea gat gga ete ett egg aca Leu Pro Ser Thr Glu Pro Asp Ciy Leu Leu Arg Thr aat git ggt gct gct cig cat gga Asn Val Cly Ala Ala Leu His Cly tot cag tta aan agt tta gaa gaa gaa tgt Tyr Cin Leu Lys Ser Leu Ciu Ciu Ciu Cys 360 <u>8</u> gig tte ace a Leu Thr

Leu Gly Leu Pro Ser Thr Leu His Ser Cys His Asp Ile Val Leu Arg

2335	}	2383	2431		2479	2527	2587	2707	2767	2827	2947	3007	3067	3168									_		105		153			201		6
						.,	, t							, w									s 57	n								249
gan gan mig ann cit gee agt cag ane ate age aga	7 + 20 8 + 5	ctg aca act acc aag agg tac gag gat cag tta Leu Thr Thr Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Asp Gin Leu	8 -	<u>.</u>	gas gag att gac aca cta aag atg tcc agt aag ggg aat tct Glu Glu lle Asp Thr Leu Lys Wet Ser Eys Cly Asn Ser		gctgy	agelaangia iigiiggace lagtaaacta gicagiglig gaaacggeet aaaacatatt tgtaaccagt gappcaaata capaacttan toteoprad	tigtaggitt ccitatgcig tittitacigi	talginangan canalatiti gintactite telahgani agnininini	ttetecagat	etetetetet etetetetet	tteagateet gtgggtttag	3									8 .	met Leu Lys	ged geg ted cet get get eec ett aan gen ett gag gte eng	3	ij	똢	35	₿,	Ξ	cga
, B	e Ser 725	. g 2		, =	S As	Ħ	g	20 E	:	1 8 1 1	tto	ctc	8 8	ř									8 ·	3 	. 8g	•	act	₽		atg.	5 E	tta
n P	: =	88.5	740 1 ta	<u>.</u> ≥ .:	88 G	actg	380	8448	gctg	ttt	, 5 88	ctct	toot	2									2 2		80	5	agt	Ser		gtc:	2	gtt
8		8 J	90 F	75.5	# # # #	. 88 . 88	acca	18 8	rtat	nata atat	tgaa	ctct	Caga	2									gtt g		t ct	3	800	Pro		£8.	=	a to
5		ar Tr	80.5	5	8 %	//O	80 ·	50 S	5	2 2	tettattata gitgaaggea	t ct	1 1	. 4									3		cet get gtt gee ett ana gea ett gag gte	2.	ge 3	5	_	t to	Š	. gat
ξ 22	Ala S. 720	8 E	20	ž	30 H	18cts	288ct	Jaget Saget	884	8888 1000	ttat	tete	Caaa	8-8-									1848		8 .	÷	383	á	30	ů,	<u> </u>	Š
7 2	2 .	80 € 80 €	735 agc a	ž	80 £	a a t	9c9	21801	gg S	at gr	ctta	tctc	2000	9999									g g g		٠ ت	3	કે ક્ષ્ય	5		Š,	o Ser	90
99 C	, z	2 17 17	~ a 2	6 05 05 05 05 05 05 05 05 05 05 05 05 05	9 3.	ttga	မ္တ	מ ב	, <u>ş</u>	8 E	ğ	agattigite atattetet etetetete	8 2	9 8									ور د		8	-	c gc	Ž		3 1	Ε	88
1,00	<u> </u>	ž č	80	,		ragtt	80	28911	1 88	ב ב ב	catt	it	3888	999									t te		80 2	: 2	g aa	n As		80 5	Š	2
982	Ē	8 E	9 -	_	sp T	cga t Arg	န္တ	180	caatacgint gicatggata	2 8	attgicasse igicatiset	ata	88 E	ģ									Cas		86 E	-	5	5	52	98	₹ 4	۵
S gaz	CE C	18 c	2	- -	بر 8 م	e et	, 28		gtat	88tt taat	aga c	gttc	188 E	tata				_					gac		S S	:	9 9	-	~	£6.	5. ⊋ 8	n Br
	Ž	8.3	730 98t 8	Į	9 3	80 €.	gete	anca anca	atac	atta atgg	tgtc	att	tete	tact				sapiens			307)		gett		ى ت 190	5	99 98	Ψ,		20 E	<u>≯</u> . ▼ ∍	200
18	5	ag (Sp	1 88 1	745	8 n	a ca L us	5	5 ag	5 e	2 T	a at	8	2 5	. 3				800			=======================================		Ξ		B0 =	ē	80	5		8 5	<u> </u>	2
5	. ₽	8 J	818		aga gaa gag nit gac aca cta aag aig icc agi aag ggg aai tel Ang Giu Giu lie Asp Thr Leu Lys Net Ser Ser Lys Giy Asn Ser	lys .	80	8 1	ua og	2 2	ctta	ttab	it to	anat	~	7.	DNA	H <sub>O</sub>		S	9	~	288		56 E		11 88	3		è .	2	ت 20
gan gen ttg aca	Giu Ala Leu Thr Giu Giu Wet Lys Leu Ala Ser Gin Asn 11e Ser Arg	cit cng gat gng cig aca act acc ang agg agit tac gag gat cag Lau Cin Asp Ciu Leu Thr Thr Thr Lys Arg Ser Tyr Ciu Asp Cin Leu	730 735 740 48t atg atg aga cac ctg tgc agc atg aat gag aca tta tct aan 5cr Hee Hee Con Hee Hee Lee Con Hee Hee Con Hee	- -	cng aga Cln Arg	700 (70) Ann ang mac mag ngt cgn tagtitigna mtagciggit ggcgacigit Lys Lys Asn Lys Ser Arg	ctiticagae cigciccige igaacagage gecagggeig agaccaegie caigciggei	Beetinagsa agetaangta iigiiggade tagtaaacta geeggigiig gaaacggeet igaaatatti aaaacatati tgiaaccagi gaagcaaata cacaaattaa totoorad	ana t gganan	genetttin anattaggii tinniticag anactennit ataigginni egnitiggin	and tgct tan	tctttttaaa	cicittiti teletelgas ggagagggas ecciceasae iteagatect sigggittas intentiale iteaciril tolanerio letianata abantasan asantesia	tonatamant catacttata toacamann manamanna a	< 210> 7	<211> 1740	<212> DNA	<213> Homo	¢(77)>	<221> CDS	<222> (49) (507)	<400>	atcaacggen ttgatttgac caatttaagt cacagtgagg cagttgea atg ctg maa		gcc agt gcc gcg tcc	5	att git gag gng gcg act cag aac gcg gag gag cag ceg agt act tic	lle Val Glu Glu Ala Thr Gln Asn Ala Glu Glu Gln Pro Ser Thr Phe	23	nge gaa nat gag tat gat gee agt tgg tee ees tes tgg gte atg tgg e fin te fin the test of the second of the test of	Ser Glu Asn Glu Ivr Asp Ala Ser Trp Ser Pro Ser Irp Val Net Trp 40 50	ctt ggg ett ece age aca ett cat age tge cae gat ata git tia ega
_						~		-	-	oc a	•	-	0 -		v	٧	٧	٧ .	٧.	v	v	Ÿ	•		50 F	•	=	=		2 (	ă .	ี

[0205]

23/ 345 393 \$ <del>4</del>89 537 ascettigig agittatatt ticagaatic agactiagit gitaaaaigi tacciaiggi 777 aatgagcaaa geteacceaa aetgigeece agaiggagia aagaeettet ggigggtett 837 tgitticagi aacigaatea tagaacgagi teigiateee teaggeeiga igicageaaa 897 aaattiiggi galaacigit eeceattiti tiligaacei agteteeage eigggigaeg 1017 gagcamgacc ctgtctcama aanamama namangactt gtgcttttca tatacatgg 1077 cccccamagc ccaccagcaa ctctgttgtt gcttaacaga ggangacagt ctgttctann 1137 getggtagaa aagetggeea gttggaeeee tgagaaacaa tatgtetgig teetgigitt 1197 gectacetea gagattitea agggeaatti tgaaaatgig taattitige tattggagit 1257 anctatatga itticagcag cgicaccata cciagcigat cicitccigc citcatcicc 1317agtacigatt taatcatett aattittitat iiitgaaaag aigtieetit taeaigitit 1377 aigiaigigi cigictataa giatcaacai tcagigaaaa gicicagita igccccagii 1437 tigittitig itccacteft ccaaacaggi aaccactitt gitacigata igicalicca 1497 gagittetet acteaaatat tiaaaaagae aaatitetit tititaaaaa titetteett 1557 gttteteate tgaaaagtag catactaaca cacagetttt aaaaacitta taettiigit 1617 ttitigitti ttittangac ggogtetgge teigittece aggitgeagt gagagagat 1677 egigecactg cactetagec tiggigacag ageaagacte tgigtenana naamanama 1737 ana atetteettt tttagatttt tgaaagaaaa eeettiggit teattgigtt igiggritag 597 gagetgetga cactgetggt atacacaggg ccasasceca etaagattgt cegtttatgt 657 ttatttaaat ggtttectaa gttagttaca tttettttag ettggaaaca gtetteeact 717 gccagtaaca acagcgtgta ctgccactgt cataaccaat accatgaatg aatatacttt 957 act cct gct tat tat gat gga aga tta aag tgt ggt gac atg att gtg

Thr Pro Ala Tyr Tyr Asp Gly Arg Leu Lys Cys Gly Asp Wet Ile Val

100

105

110

110

110

110

111

110

110

110

110

110

110

110

120

120 gag aac cac acc aat cag cct tit tic att aaa act att gic tig gga Giu Aan His Thr Asn Gin Pro Phe Phe lie Lys Thr lie Val Leu Giy ccc atg itg aag gag cag agg aac aaa gtc act ctg acc git ait igt Pro Wet Leu Lys Giu Gin Arg Asn Lys Val Thr Leu Thr Val lie Cys teg cet ege age ett gta t agattiteg aaatiggitt caaatetige Irp Pro Cly Ser Leu Val 32 20

[0206]

<210> 8 <211> 1574 <212> DNA <213> Howo saptens <220>

<2220> <221> CDS

cag ttg aca aac ccc tat gga agc tgg aga atg cat acc aag atc git Gin Leu Thr Asn Pro Tyr Cly Ser Trp Arg Wet His Thr Lys 11e Val 255 260 260 ccc cca tgg gca ccc cct aag cag ccc atc ctt aag acg gtg atg atc Pro Pro Trp Ala Pro Pro Lys Gin Pro lle Leu Lys Thr Val Wet lle Val Phe Glu Lys Asp Val Leu Glu Tyr Val 245 Gin Giu Asp Val Pro Lys 235 240

819

867

915 cet gge cet eag etg aaa eea gaa gaa gaa tat gaa gag gea eaa gga Pro Gly Pro Gln Leu Lys Pro Glu Glu Glu Tyr Glu Glu Ala Gln Gly 285 290 295 270

696 gag gcc cag aag cct cag cta gcc tgatgacaaa aatgacttct agggtgaagc Glu Ala Gln Lys Pro Gln Leu Ala 300 ans

accacagg caggatcag aguitgant ganaigitis caggigitis gananatiti 1329 gatgagitic gananatiti cagaiggicag gregogicis gaccagciti cagaiggicag 1389 nagigganga tgagcitat gagaggatg gregogicis gregogica ganaigag actgagaga 1449 aninating gittataaga cattlaagag gcccttitic atalacigac tcacigatga 1509 atagcatit gcattitatg gananatata anigcaanga nataattaa anananana 1569 anana atgactgatg actgggccct agcaggtggc aggtataaca tggccatgga cactettett 1149 ttttaaattt tatgictage tictgagict agaigaaaga cagtaigitt cagagaacai 1209 iggatateag titilicecae ageagggaci gigagagaca aceageagea tectetitgi 1269 ctgggtgatg aggetgetgg aagetttgaa gteteceatt eeecteatge tataaaaga 1029 actacetity tictetecea teetgeteng giettiteng engietenie atengenaee 1089

[0207]

agteeteagg eeetgggaea getgetgagg aaggagaa gaeeeaggag agee atg <400>

23

105 153 ang oct agg ann got gag oct cat ago tto ogg gng ang git tto ogg Lys Pro Arg Lys Ala Glu Pro His Ser Phe Arg Glu Lys Val Phe Arg ang ana cct cca gtc tgt gca gta tgt aag gtg acc atc gat ggg aca Lys Lys Pro Pro Val Cys Ala Val Cys Lys Val Thr lle Asp Gly Thr 2

249 2 
 8gc gtt teg tgc aga gtc tgc aag gtg gcg acg cac aga aaa tgc gaa

 GJy Val Ser Cys Arg Val Cys Lys Val Ala Thr His Arg Lys Cys Glu

 35
 40
 45

 gca aag gtg act ten gcc tgt cag gcc ttg ccc ccc gtg gag ttg cgg
 50
 60

 Ala Lys Val Thr Ser Ala Cys Gln Ala Leu Pro Pro Val Glu Leu Arg
 60
 65

 50
 60
 65
 65
 2

<210> 9

sapiens

<213> Homo <211> 1368 <212> DNA

<222> (55) .. (837)

<221 > CDS

<220>

特開2001-352986

Ē

<222> (22) .. (939)

<400>8

885683cttt gc888aacaa g atg gca gcc ccc ata cct caa ggg ttc tct Met Ala Ala Pro lle Pro Gln Gly Phe Ser

tgt tta tcg agg ttt ttg ggc tgg tgg ttt cgg cag cca gtt ctg gtg Cys Leu Ser Arg Phe Leu Gly Trp Trp Phe Arg Cln Pro Val Leu Val act cag tee ges act ata get eea gia aga act aaa aaa egt ite aca Thr Gin Ser Ala Ala lie Val Pro Val Arg Thr Lys Lys Arg Phe Thr

7

8

195

cet cet att tat caa eet aaa tit aan aca gan aag gag itt atg caa Pro Pro lie Tyr Gin Pro Lys Phe Lys Thr Giu Lys Giu Phe Met Gin

cat gcc cgg ann gca gga tig git ait cct cca gan ann tog gac cgt His Ain Arg Lys Ain Gly Leu Val Ile Pro Pro Giu Lys Ser Asp Arg

243

65

toc ata cat cig got tgt aca got ggt ata tit gat got tat git cot Ser lie lits Leu Ala Cys Thr Ala Ciy lie Phe Asp Ala Tyr Val Pro 75

591

75 80 85 00 cct gag ggt gat gca cgc ata tca tct tca ang gag gga ctg ata Pro Glu Gly Asp Ala Arg Ile Ser Ser Leu Ser Lys Glu Gly Leu Ile

339

9 8

gng aga act gna cga atg aag aag act atg gca tca caa gtg tca atc Clu Arg Thr Clu Arg Wet Lys Lys Thr Wet Ala Ser Cln Val Ser lle

387

cgg agg ata naa gac tat gat gcc aac ttt aaa ata aag gac ttc cct Arg Arg IIe Lys Asp Tyr Asp Ala Asn Phe Lys IIe Lys Asp Phe Pro 110

435

888 aaa gct ang gat atc ttt att gaa gct cac ctt tgt cta aat aac Ciy Lys Ala Lys Asp Ile Phe Ile Ciu Ala His Leu Cys Leu Asn Asn

483

tca gac cat gac cga ctt cat acc ttg gta act gan cac tgt ttt cca Ser Asp His Asp Arg Leu His Thr Leu Val Thr Glu His Cys Phe Pro 155 160 160 170

gac atg act tog gac atc asa tat asg acc gtc egc tog agc ttt gtg Asp Wet Thr Trp Asp lie Lys Tyr Lys Thr Val Arg Trp Ser Phe Val

gan tet tta gag ece tet eat git git ean git ege tgit ean ag t atg Giv Ser Leu Giv Pro Ser His Val Val Gin Val Arg Cys Ser Ser Wet

627

675

723

579

23

nig and dag ggd nad gig the ggd dag atd add gta egd atg dad add Net Asn Gin Gly Asn Val Tyr Gly Gin lie Thr Val Arg Net His Thr gge egg ttg atg tat Gly Arg Leu Het Tyr Ħ B ₹

돈 cag act ctg gcc atc tat gac cgg Gin Thr Leu Ala He Tyr Asp Arg 220 225

gan gat gin ccc ang gat gic cig gag tat git gin tic gan ang

77

S

270

318

366

₹

462

210

558

8

125

40

654

8t8 Val

702

165

750

aas Lys

tac oto tigh tit cith agg and att cith con int cag the Tyr lie Cys Phe Lew Ang Lys lie Lew Pro Tyr Gin Lew

acc tcc | Thr Ser 1

(43)

2

ალიილეთვი იცუოგოგოგი ცგოიცვენც catatacaat tititigaagc ნგინგოვლე 60 cacaagcaig iggaagcaga grigaggagt cgariggca ciciggagac agaagcagcc 120 cgg tac aac gct ctg aac gtt cca ctc cac aat agg aga cac cag ctg Arg Tyr Asn Ala Leu Asn Val Pro Leu His Asn Arg Arg His Gin Leu 70 °^ ang ctg cag anc gac ang gct ann cta gag gtg ann tet cag act eta Lys Leu Gin Asn Asp Lys Ain Lys Leu Giu Vai Lys Ser Gin Thr Leu gaa aag gaa gcc aag gaa tgt cga crt cga acg gaa gaa tgt caa tta Ciu Lys Ciu Ala Lys Ciu Cys Arg Leu Arg Thr Ciu Ciu Cys Cin Leu cag tta ang act ctt cat gan gat ttg tca ggt aga tta gag gan tcc Gin Leu Lys Thr Leu His Giu Asp Leu Ser Giy Arg Leu Giu Giu Ser 40 50 tta tca atc atc aat gaa aaa gta cct ttt aat gat aca aaa tat agt Leu Ser lie lie Asn Giu Lys Val Pro Phe Asn Asp Thr Lys Tyr Ser ang atg cga gat att get ggg cag gec etg get tit git cag gat ett Lys Wet Arg Asp lie Ala Gly Gin Ala Leu Ala Phe Val Gin Asp Leu gig acg get ett eta aac tit eat ace tae aca gaa egg ati eaa Val Thr Ata Leu Leu Asn Phe His Thr Tyr Thr Giu Gin Arg lie Gin att tit oct git gat ict goc att gac act ata ict oca itg aat cag lie Phe Pro Val Asp Ser Ala lie Asp Thr lie Ser Pro Lew Asn Cln cagcaccaag etgiggitga eggicteace eggaagiac aig gaa acc ait gag Met Glu Thr lle Glu ang tic ten can tac ett eat gan nat geg tee tat gte ege eet ett Lys Phe Ser Cln Tyr Leu His Clu Asn Ala Ser Tyr Val Arg Pro Leu gte tig gag aca act gig aan tig ann act tit ten gan eac tia Val Leu Glu Thr Thr Val Lys Leu Lys Thr Phe Ser Glu His Leu 8ge ang cit cat ita tit gaa agi atc aci gag gat aci Gly Wet Leu His Leu Phe Glu Ser Ile Thr Glu Asp Thr <222> (160).. (2004) <212> DNA <213> Homo sapiens 120 <210> 10 <221> CDS <400> 23 Bag Baa ( Clu Clu ( 150 35 <220> 35 297 393 ₹ 537 282 igcagcagat ggictgiaga gittcciggg gcagccacaa acagggiggi gtaaaacagi 1057 gggcaggica cetgaggcca ggagittgan actagectgg ceaggtgaaa ceeeatetet 1177 accanasata tananatata aanattaget gggegtggtg gtgggegeet gtaateecag 1237 ctacticagan ggictgaugen gengaatige tigaacicing gagacgangs tigicagigag 1297 cceacacggi accactgiac tecasaanaa 1357 accacacggi cagactccgi cicasaanaa 1357 anananaaaa a 633 68 129 777 825 877 citicicas elgacacti aggaaccai cieccigga gocaccit tegitgagag 937 iccitigcig teagetinge acticeacci eccititate actagiacig eaacatagic 997 cgg cnc cgg ggc cac ctg cgc gag ctg gcc cat gtg ctg can tcc ang Arg His Arg Cly His Leu Arg Clu Leu Ala His Val Leu Cln Ser Lys 130 cgn aac acg gcc cca gtc ngg cgc ata gag cac ctg gga tcc acc aaa Arg Asn Thr Ala Pro Val Arg Arg lle Clu His Leu Gly Ser Thr Lys tet cig anc cac tea ang cag cgc agc act ctg ccc agg agc tto agc Ser Leu Asn His Ser Lys Cin Arg Ser Thr Leu Pro Arg Ser Phe Ser ctg gac ccg ctc atg gag cgg cgc tgg gac tta gac ctc acc tac gtg Lew Asp Pro Lew Wet Clu Arg Arg Trp Asp Lew Asp Lew Thr Tyr Val acg gag cgc atc tig gcc gcc gcc tic ccc gcg cgg ccc gat gaa cag Thr Giu Arg lie Leu Ala Ala Ala Phe Pro Ala Arg Pro Asp Ciu Cin cac cgg gac aag tac ctg ctc ttc aac ctt tca gag aaa agg cat gac His Arg Asp Lys Tyr Leu Leu Phe Asn Leu Ser Giu Lys Arg His Asp cig acc cgc tta aac ccc aag gtt can gac ttc 83c tgg cct gag ctg Leu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Val Gin Asp Phe Gly Trp Pro Giu Leu cat get cea ece etg gae aag etg tge tee ate tge aaa gee atg gag His Ala Pro Pro Leu Asp Lys Leu Cys Ser Ile Cys Lys Ala Wet Glu aca 1989 etc agt get gac cca cag cac gtg gtc gta eta tac tgc aag Thr Trp Leu Ser Ala Asp Pro Cin His Val Val Val Leu Tyr Cys Lys 195 205 818 895 cag gae ctc 898 ftc cct 88f gcc tgg agg ttc cag gtc agc Val Ciy Cin Asp Leu Ciy Phe Pro Ciy Ala Trp Arg Phe Cin Val Ser 210 220 225 ang 83c nag cit 83g gic atc git ict gcc tac aig cac tac age aag lys Ciy lys Leu Ciy Val 11e Val Ser Ala Tyr Wei His Tyr Ser Lys cig gng etc cen gac cet ent ecc tgt etc tet gte tgt eng gga nac Leu Giu Leu Pro Asp Pro His Pro Cys Leu Ser Val Cys Gin Gly Asn <u>8</u> ate tet gea ggg tgaggeteec agegeetgag tagetgette eccagtggee He Ser Ala Gly 72 8 170

91

[0208]

特開2001-352986

<del>(</del>12)

		Asn Ala Ala Val Ser Asn Thr Ala Gly Gln Asp Glu Ala Thr Ala Lys
tta aga Leu Arg		8ct 818 ttg gag coc att cag age acc agt cta att ggg act tta acc 1614 Ala Val Leu Glu Pro Ile Gln Ser Thr Ser Leu Ile Gly Thr Leu Thr
gcc agg ant cta gag ctg (cc cag gac atg ann ann atg aca gct gtg 846 Aln Arg Asn Leu Glu Leu Ser Gln Asp Wet Lys Lys Wet Thr Aln Val 215 216 217 218 218 219 219 219 219 219 219 219 219 219 220		470 485 agg aca fot gac agt gag gut cca gat gtg gaa tot ogt gaa gac tta 1662 Arg Thr Ser Asp Ser Clu Vai Pro Asp Val Clu Ser Arg Clu Asp Leu 499 495
Phe Giu Lys Leu Gin Thr Tyr lie Aia Leu Leu Aia Leu Pro Ser Thr 230 240 245 808 cca gat gga ctc ctt cgg aca anc tac agt tct gig tta aca aat 942 Giu Pro Asp Giy Leu Leu Arg Thr Asn Tyr Ser Ser Val Leu Thr Asn		att aan aat ege tac aig gea agg ata gig gaa ett aeg ict eag itg 1710 lle Lys Asn Arg Tyr Wet Ala Arg lle Val Glu Leu Thr Ser Gln Leu 500 510 515 eag ett gac agt aag tea gig eat itt tat gee gag ige ega gee 1758
250 260 get get get et gan tti cat gac get atg nan gat att tec 990 Val Cly Ala Ala Leu His Cly Phe His Asp Val Net Lys Asp lie Ser 270 270 270 270 270 270 270 270 270 270		Glu Cys Arg Ala 530 gaa gca ttg aca Glu Ala L eu Thr
Thr Ala		atg aaa ctt gcc Wet Lys Leu Ala 555
Thr Gin Lys Leu lie Thr Thr Asn Asp Cys lie Leu Ser Ser Val Yal 295 300 305 305 862 tea aca aat 8ga gea gag ang att gea tee tte tte age aac aat 1134		agt tac gag gat cag tta agt atg atg Ser Tyr Clu Asp Cln Leu Ser Net Net 575
Ala Ser Thr Asn Gly Ala Gly Lys 11e Ala Ser Phe Phe Ser Asn Asn 310 326 326 325 tig gac tac tic att get tea cig age tat ggs ect aag gea gg 1182 Leu Asp Tyr Phe 11e Ala Ser Leu Ser Tyr Gly Pro Lys Ala Ser and 315 315		gac cac ctg tgc age atg aat gag aca tta tet aaa cag aga gaa gaa gag Asp Mis Leu Cys Ser Met Asn Glu Thr Leu Ser Lys Gln Arg Glu Glu 585 590 att gac aca cta aag atg tee agt aag gag aat tet aaa aag acc aag 1998
		ile Abp int Leu Lys wet Ser Ser Lys Liy Ann Ser Lys L ys Asn Lys 600 882 cga tagittigaa atagetggit ggegacigit cittecagae cigetecige 2054 Ser Ang
Lys Ala Ala Ala Tyr Wet Lys Ser Leu Arg Lys Pro Leu Leu Clu Ser 360 360 365 818 cet tat gaa gaa etg gea aac ege ege ate ett ete age tet 1326 918 Pro Tyr Clu Clu Ala Leu Ala Asa Arg Arg Ile Leu Leu Ser Ser 316 386		tgeacagage egeagggetg agaceaegte catgetgget geetteagga agetaaagta 2114 tigttggace tagtaaacta gicagigtig gaaaeggeet tgaaatattt aaaacatatt 2174 tgtaaccagt gaagcaaata cagaagitga tgttggeugt aaatggaaaa caataegtat 2234 gicatggata tigtaggitt centaigetg titttacigt gaatittia aaataaggt 2294
nct gan agt can gan age ctt gca cag caa gtt can cag agt ttg gan 1374 Thr Giu Ser Arg Clu Giy Leu Aia Gin Cin Vai Gin Gin Ser Leu Giu 390 405		egettiggin tetatggant agatatgtgt ttettganan manananna mana 2408
ang att tet aas etg gag cag gaa aas gaa eat tgg atg ttg gas ges 1422 Lys lie Ser Lys Leu Giu Gin Giu Lys Giu His Trp Net Leu Giu Ala 410 410	[0209]	<210> 11
cna tta gcc ana atc ang cta gog aan gaa nac cag cga att gca gat 1470 Gin Leu Ala Lys Ite Lys Leu Giu Lys Giu Asn Gin Arg Ite Ala Asp 425 435		<2125 RWA <2135 Artificial Sequence <2205
ang cig aag nat aca ggt agt gcc cag cig git ggg cig gcc cag gaa 1518 Lys Leu Lys Asn Thr Cly Ser Ala Cin Leu Val Cly Leu Ala Cln Clu 440 450		<223- an artificially synthesized oligo-cap linker sequence <400- 11 ageaucgagu eggecunguu ggecuncupg 30
nal get get gig ica nat aci get gge cag gai gaa gee aca get aag   1566	[0210]	

	(44)	特開2001—352986	(48)	特開2001-352986
	10	92	63	ā
	¢210s 12		2213. Arrificati Sements	
	2111- 42		שני או רוווכומו ספלתפוורפ	
	24 <1125		<0.72>	
	VIII <217>		<223> an artificially synthesi zed primer sequence	
	<213> Artificial Sequence		<400> 17	
	<2.5 0>		catttactge egacateane t	21
	<2235 an artificially synthesized oligo(dT)primer sequence	[0216]		
	<400> 12		<210> 18	
	geggetgaag aeggeetatg tegeettitt tittititt ti	45	<211> 21	
[1120]			- DNA - 512>	
	<210> 13		<213> Artificial Sequence	
•	<2115-21		<220>	
	<21.2> DNA		<223> an artificially synthesized primer sequence	
	<213> Artificial Sequence		<400> 18	
	<220>		gcgaaaalga gtatgatgcc a	21
	<2235 on artificially synthesized primer sequence	[0217]	:	
	<400> 13		<210> 19	
10.00	agcolcgagt cggccttgtt g	21		
[2   20]			<212> DNA	
	<210> 14		<213> Artificial Sequence	
	<21  > 21		<220>	
	<212> DNA		<223> an artificially synthesized primer sequence	
	<213> Artificial Sequence		<400> 19	
	<520>		getectanne cacanacaen at	22
	<223> an artificially synthesized primer sequence	[0218]		
	<400> 14		<210> 20	
	gcggctgang acggcctatg t	21	<211> 21	
			<212> DNA	
[0213]			<213> Artificial Sequence	
	<210> 15		<220>	
	<211> 10		<223> an artificially synthesized primer sequence	
	<21.2> DNA		<400> 20	
	<213> Artificial Sequence		acgaatgaag aagactatgg c	21
	<220>	[0219]		
	<223> an artificially synthesized NF-kappaB-binding-site sequence	e,	<210> 21	
	<400> 15		<211> 20	
,	ggganattcc	01	<212> DNA	
[0214]			<213> Artificial Sequence	
	<210> 16		<220>	
	<211> 22		<223> an artificially synt hesized primer se quence	
	<21.2> DNA	•	<400> 21	
	<213> Artificial Sequence		agggatcatc accgletta	20
	<220>	[0220]		
	<223> an artificially synthesized pri mer sequence		<210> 22	
	<400> 16		<211> 20	
	antenetaen tygenagynt ng	22	<21.2> DNA	
[02:4]			<213> Artificial Sequence	
(6   70)	.210. 17		<0.27>	
	/I <017>		<22.55 an artificially synthesized primer sequence	
	-21.5 E1		77 <00%	£
	vin <212>		בנכשונככום וכוכוכופוכ	07

(20

[882]

[83]

35 8 g

5:果質、06:視床、07:肾腫、08:膵臓、09 0:肝臓、21:肺、22:リンパ節、23:乳腺、2

特開2001-352986

(49)

<210> 23

[0221]

<2115 20 <2125 DNA

<213> Artificial Sequence

<250>

<223> an artificially synthesized primer sequence <400> 23

gttcangcan ttetectgee

【図面の阿単な説明】

相果である。

01:町臂、02:脳、03:尾状核、04:海陽、0 全図中に記載の数字、英字は以下の通りである。 【符号の説明】 【図1】は、PCR法を用いて、35種のヒト組織(職 器)におけるCOL03279転写物の発現量を調べた

【図2】は、PCR法を用いて、35種のヒト組織(観報)におけるCOL06772転写物の発現量を関へた

路下垂体、10:小脚、11:骨柱、12:扁桃体、3:小粒、14: 粗架、15:胎児缸、16:胎児野 職、17: 胎児肝臓、18: 胎児肺、19:心臓、2

> 【図3】は、PCR法を用いて、35億のヒト組織(賦器)におけるADKA01604転写物の発現置を開へ 格果である。

た結果である。

56,28:脊柱、29:脾膜、30:胃、31:精巣、

【図4】は、PCR法を用いて、35個のヒト組織(職制)におけるADSU00701配写物の発現量を開く

	-352986
	T 0 0 7 E
/44)	

特閒2001-352986

(25)

	ğ Ş	嘉基 图	ĝ.	
	2F.3		18 4	g 23 g 2
	2		1	
	9			
	2		10. 19.11	N. The latest the same of the
(⊠4)	0			8
_	8			8
	8		1	
	8			
	5. ≱r		3	999 6
	<u> </u>	3 5 E	5	- B == -
	-			

ソロントムージの扱む

A	1	K	39/395	A	1	K	48/00	4	80	6	5
A	6	1	K	48/00	4	80	6	5			
A	6	1	M	4	6	1	M	4	6	8	
A	6	1	M	4	6	8	4	6	8		
A	6	1	M	4	6	8	4	6	8		
A	6	1	M	4	6	8					
A	6	1	M	4	6	8					
A	6	1	M	4	6	8					
A	6	1	M	4	6	8					
A	7	M	4	6	8						
A	8	9	1	1	1						
A	8	9	1	1	1						
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	1	1								
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1	1							
A	9	9	1								
A	9	9	1								
A	9	9	1								
A	9	9	1								
A	9	9	1								
A	9	9	1								
A	9	9	1								
A	9	9	1								
A	9	9	1								
A	9	9	1								
A	9	9	9								
A	9	9	9								
A	9	9	9								
A	9	9	9								
A	9	9	9								
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A	9	9									
A											

4C085 ANII DD62 4B045 ANIO ANII AA20 AA30 BAIO CA40 DA75 EA20 EA50 FA7I ' FA74

	33/50 2	33/53 D	×	33/566	C 1 2 P 21/08	(C   2 N   1/2	C 1 2 R 1:19)	(16:1	C12N 15/00 ZNAA	37/02	C12N 5/00 A	C12R 1:91)	Fターム(参考) 28030 A803 A005 CA06 CA17 CA19	20045 AA34 AA35 BB20 CB01 CB02	CB17 DA12 DA13 DA14 DA36	FB02 FB03	48024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA05	CA20 DA03 EA04 FA02 FA06	CA13 CA14 CA18 HA11	4B063 QA01 QA13 QA17 QA19 QQ43	QR55 QR62 QS16 QS25 QS34	000	4B064 AC01 AC26 AC27 CA02 CA10	CA11 CA19 CA20 CC01 CC24	DA01 DA13	4B065 AA26X AA93X AA93Y AB01	ACI4 ACI6 BA03 BA05 BA25	BB01 BC03 BC07 BD50 CA24	CA44 CA46	4C084 AA01 AA13 AA18 CA23 CA49	NA14 ZA361 ZA362 ZA451	ZA452 ZA591 ZA591 ZA751	ZA752 ZA891 ZA892 ZA971	ZA972 ZB131 ZB132 ZB151	ZB152 ZB261 ZB262 ZB331	ZB332 ZB351 ZB352 ZC351	ZC352 ZC551 ZC552
	21/02	1/68	33/15	33/50	33/53		33/566	21/08	12/1	(61:1	2/10	(16:1	中村 右輪	神奈川県徴兵市曹駿区あざみ野1-17-33	菅野 純夫	東京部が並以南牧[4-8-13																					
C 1 2 N	C12P	C12Q	N   0 D					// C12P	(C 1 2 N	CIZR	(C I 2 N	CIZR	(72) 発明者		(72) 発明者																						•

## This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☑ BLACK BORDERS
☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
☐ FADED TEXT OR DRAWING
☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
□ OTHER:

## IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.